

Aus der Abteilung für Pneumologie  
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
Leiter: Herr Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität  
Marburg und dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

**Die Bedeutung der Surfactantproteine SP-A und SP-D bei der Modulation  
des Entzündungsprozesses im Rahmen des chronischen Asthma  
bronchiale**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Isabell Diogo**  
aus Plauen

**Marburg, 2011**

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg am 24.03.2011  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund  
Referent: Prof. Dr. B. Müller  
Koreferent: Prof. Dr. S. Vogt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Allergisches Asthma</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie des allergischen Asthmas .....	2
1.1.2	Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale .....	4
<b>1.2</b>	<b>Zytokine und Zytokinrezeptoren</b>	<b>10</b>
1.2.1	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF-Rezeptor 1 und 2.....	10
1.2.2	Interleukin-5 und Interleukin-5-Rezeptor.....	13
1.2.3	Interleukin 4 und Interleukin-4-Rezeptor $\alpha$ .....	14
1.2.4	Interleukin 13 und Interleukin-13-Rezeptor $\alpha 1$ und $\alpha 2$ .....	15
1.2.5	Interleukin-10 und Interleukin-10-Rezeptor $\alpha$ und $\beta$ .....	16
<b>1.3</b>	<b>Bedeutung des Surfactant beim allergischen Asthma</b>	<b>17</b>
1.3.1	Bedeutung von Typ-II-Pneumozyten auf Surfactantmetabolismus und allergisches Asthma.....	18
1.3.2	Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine SP-A und SP-D.....	19
1.3.3	Funktion der Surfactantproteine A und D und deren Rolle beim allergischen Asthma.....	21
1.3.4	Phänotyp von SP-D Knock out (SP-D-/-) Mäusen.....	23
1.3.5	Phänotyp von SP-A Knock out (SP-A-/-) Mäusen.....	24
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>26</b>
2.1.1	Chemikalien, Lösungen, Medien, Laborgeräte und Tiere .....	26
2.1.2	Antikörper.....	28
2.1.3	Enzyme .....	28
2.1.4	PCR-Primer .....	28
2.1.5	Software.....	29
<b>2.2</b>	<b>Lösungen und Medien</b>	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
2.3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	32
2.3.2	Induktion der chronisch-allergischen Atemwegsinfammation .....	32
2.3.3	Tierpräparation .....	33
2.3.4	Isolation von Typ-II-Pneumozyten .....	33
2.3.5	RNA-Isolation .....	34
2.3.6	Proteinisolation.....	35
2.3.7	cDNA-Synthese.....	35
2.3.8	cDNA-Amplifikation mittels Reverser Transkription.....	36
2.3.9	Agarosegelelektrophorese .....	37
2.3.10	Immunhistologie.....	37

2.3.11	Bestimmung von Zytokinen mittels CBA-Flex-Cytometer.....	38
2.3.12	Statistische Auswertung .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Proteinmengen in bronchoalveolärer Lavage und Plasma</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung von IL-5 mit dem CBA-Flex-Cytometer</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-4 und IL-4R<math>\alpha</math>1</b>	<b>45</b>
3.3.1	mRNA und Proteinexpression von IL-4R $\alpha$ .....	45
3.3.2	Immunhistochemische Detektion von IL-4R $\alpha$ .....	47
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-13, IL-13R<math>\alpha</math>1 und IL-13R<math>\alpha</math>2</b>	<b>48</b>
3.4.1	mRNA-Expression von IL-13R $\alpha$ 1 .....	49
3.4.2	Immunhistochemische Detektion von IL-13R $\alpha$ 1 .....	50
3.4.3	mRNA-Expression von IL-13R $\alpha$ 2.....	51
3.4.4	Immunhistochemische Detektion von IL-13R $\alpha$ 2 .....	52
3.4.5	Bestimmung von IL-13 mit dem CBA-Flex Cytometer.....	53
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu TNF<math>\alpha</math>, TNFR1 und TNFR2</b>	<b>54</b>
3.5.1	mRNA-Expression von TNFR1 .....	54
3.5.2	Immunhistochemische Detektion von TNFR1 .....	56
3.5.3	mRNA-Expression von TNFR2 .....	57
3.5.4	Bestimmung von TNF $\alpha$ in Plasma und BAL mittels CBA-Flex-Cytometer.....	59
<b>3.6</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-10, IL-10R<math>\alpha</math> und IL-10R<math>\beta</math></b>	<b>61</b>
3.6.1	mRNA-Expression von IL-10R $\alpha$ .....	61
3.6.2	Immunhistochemische Detektion von IL-10R $\alpha$ .....	63
3.6.3	mRNA-Expression von IL-10R $\beta$ .....	64
3.6.4	Bestimmung der IL-10-Konzentration in Plasma und BAL mittels CBA-Flex-Cytometer .....	66
<b>3.7</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu SP-D</b>	<b>67</b>
3.7.1	mRNA-Expression von SP-D in Wildtyp- und SP-A-/- Tieren .....	67
3.7.2	Immunhistochemische Detektion von SP-D .....	68
<b>3.8</b>	<b>Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu SP-A</b>	<b>69</b>
3.8.1	mRNA-Expression von SP-A in Wildtyp- und SP-D-/- Tieren .....	69
3.8.2	Immunhistochemische Detektion von SP-A .....	71

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Erhöhte Proteinkonzentration in BAL und Serum nach Allergieinduktion</b>	<b>72</b>
<b>4.2</b>	<b>SP-A - mRNA-Expression in Wildtyp- und SP-D-/- Tieren</b>	<b>73</b>
<b>4.3</b>	<b>SP-D - mRNA-Expression in Wildtyp- und SP-A-/- Tieren</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-4R<math>\alpha</math></b>	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>Rolle von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-13R<math>\alpha</math>1 und IL-13R<math>\alpha</math>2</b>	<b>75</b>
<b>4.6</b>	<b>Relevanz von SP-A und SP-D bei der Expression von TNF<math>\alpha</math>, TNFR1 und TNFR2</b>	<b>77</b>
<b>4.7</b>	<b>Bedeutung von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-10R<math>\alpha</math> und IL-10R<math>\beta</math></b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis (alphabetisch)</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung</b>	<b>99</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergisches Asthma

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, deren Prävalenz vor allem in den westlichen Industrienationen stetig steigt (Varner, 2002). Nach Angaben der WHO leiden weltweit zirka 155 Millionen Menschen an Asthma, darunter befinden sich schätzungsweise 4 Millionen Patienten in Deutschland. Betrachtet man die jährliche Mortalitätsrate von ungefähr 180.000 Toten/Jahr, erscheint diese im Vergleich mit der Sterberate verschiedener Infektionskrankheiten zweifellos gering, allerdings führt die Erkrankung bei den Betroffenen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität, was sich in einer deutlichen finanziellen Belastung der Gesundheitssysteme widerspiegelt. So belaufen sich die gesamtgesellschaftlichen Kosten, die sich aus Kosten für Arzneimittel, Krankenhausaufenthalten und z.B. Frühberentung zusammensetzen laut WHO auf jährlich bis zu 6 Milliarden Dollar.

Ätiologisch lässt sich das Asthma bronchiale in eine intrinsische, d.h. nicht-allergische, und eine extrinsische, d.h. Allergen-assoziierte Form einteilen. Mehr als 85% der Asthmaerkrankungen lassen sich dabei auf allergische Faktoren zurückführen, bei denen vor allem Aeroallergene wie Milbenkot, Pollen und Tierepithelien als Hauptverursacher im Vordergrund stehen.

Klinisch verursacht die allergische Entzündung vor allem nachts und in den frühen Morgenstunden intermittierend auftretende Episoden von Stenoseatmung, Atemnot und Husten. Typischerweise sind diese Symptome mit anfallsweise auftretender, spontan oder nach Therapie sistierender Atemwegsobstruktion assoziiert, die durch die erhöhte Bereitschaft der kleineren und mittleren Atemwege auf unspezifische Reize mit einer Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu reagieren gekennzeichnet ist.

Histologisch zeigt sich beim Asthma bronchiale eine Inflammation der mittleren und kleinen Atemwege, die durch das Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Typ 2-T-Helferzellen ( $T_H2$ -Zellen) charakterisiert ist (Cohn et al., 2004). Die akute bronchiale Hyperreagibilität (AHR), d.h. die gesteigerte Empfindlichkeit der kleinen und mittleren Atemwege gegenüber unspezifischen

Stimuli, wie z.B. Kälte, wird durch die simultan vorliegende neurogene Entzündung ausgelöst (Whitehead et al., 2003). Die von TH2-Zellen sezernierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 lassen sich dabei mit typischen, die chronische Phase der Entzündung charakterisierenden Merkmalen wie erhöhter Mucusproduktion und –sekretion, sowie strukturellen Umbauvorgängen des Atemweggewebes (airway-remodelling) assoziieren.

### **1.1.1 Ätiologie des allergischen Asthmas**

Ätiologisch stellt das Asthma bronchiale eine multifaktorielle Erkrankung dar, zu deren Entstehung sowohl endogene, d.h. genetische, als auch exogene Faktoren beitragen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die endogenen Faktoren eine allergische Prädisposition schaffen und die exogenen Faktoren zu einer immunologischen Dysfunktion führen, in deren Konsequenz es dann zur Ausprägung eines asthmatischen Phänotyps kommt.

Im Rahmen humangenetischer Studien (Tattersfield et al., 2002) konnten eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert werden, deren Sequenzen für eine Reihe von Faktoren codieren, die innerhalb der allergischen Entzündungsreaktion, der bronchialen Hyperreagibilität und der Sekretion asthmatypischer Proteine eine wesentliche Rolle spielen. Eine direkte Kausalität zwischen genetischer Variation wie „single nucleotide polymorphisms“ und Krankheitsausprägung konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden. Derzeit sind Polymorphismen von 64 verschiedenen Genloci beschrieben, die mit der Entstehung eines Asthma bronchiale in Verbindung gebracht werden können (Hoffjan et al., 2002). Dabei scheinen vor allem Veränderungen, die sich z.B. in dem für die Zytokine IL-4, IL-5 oder IL-13 codierenden Bereich des Chromosoms 5 ereignet haben, die Tendenz zur Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps zu erhöhen (Heinzmann et al., 2000). Weitere Genregionen besonderen Interesses befinden sich auf den Chromosomen 11, 12 und 16. Sie tragen u.a. Informationen, die für den IL-4-Rezeptor (Sandfort et al., 2000), den signal transducer and activator of transcription-6 (STAT-6) (Gao et al., 2000), Interferon- $\gamma$  (Barnes et al., 1996) und die  $\beta$ -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc $\epsilon$ RI) kodieren (Hizawa et al., 2000).

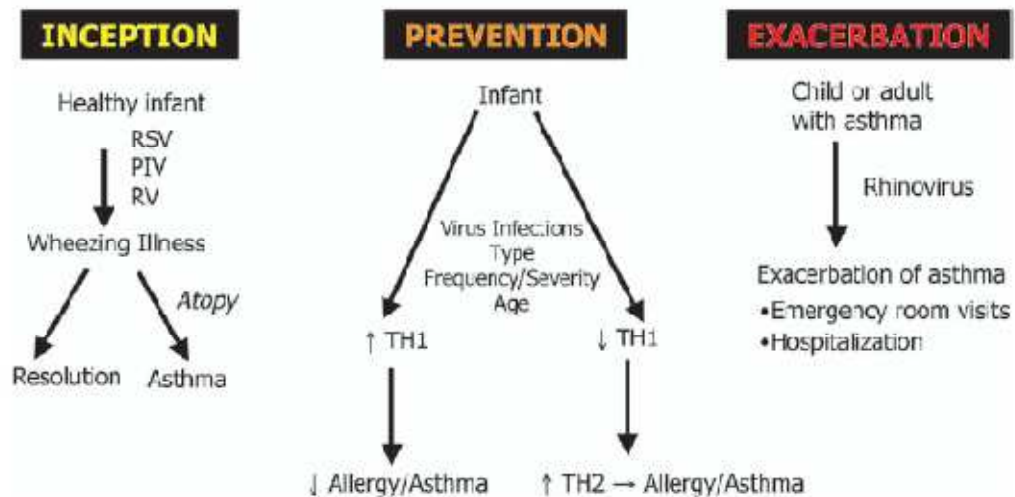
Die Komplexität der genetischen Expressionsmuster allein reicht allerdings nicht aus, um die zunehmende Prävalenz des allergischen Asthma bronchiale zu erklären. Vielmehr nehmen eine Vielzahl exogener Faktoren einen großen Einfluss auf die

Initiation dieser Erkrankung. So spielen z.B. sowohl bakterielle als auch virale Infektionen bei der Entwicklung des Asthma bronchiale eine besondere Rolle. So wird einer bakteriellen Infektion im Rahmen der Hygiene-Hypothese (Strachan et al., 1989) eine protektive Rolle zugesprochen, da der Prävalenzanstieg mit ständig verbesserten hygienischen Verhältnissen und einer damit verbunden, verminderten Anzahl frühkindlicher Infektionen einhergeht. Riedler und Braun-Fahrlander (2002) konnten dabei zeigen, dass lediglich das Vorhandensein von Endotoxinen auf der Bakterienoberfläche und deren verstärkte Exposition in der Kindheit mit einem verringerten Auftreten von Asthma bronchiale korrelierte. So spielt die Interaktion der Endotoxinkomponente mit Toll-like-Rezeptoren (TLR), wichtigen Komponenten der angeborenen Immunität, eine wesentliche Rolle bei der Induktion einer  $T_H1$  gewichteten Immunantwort.

Der Einfluß viraler Infektionen auf die Initiation und den Verlauf der asthmatischen Erkrankung lässt sich kontrovers diskutieren. Zum einen führen z.B. frühkindliche Infektionen mit dem Respiratory Syncytial Virus (RSV), einem einzelsträngigem RNA-Virus aus der Gruppe der Paramyxoviren, zu einer Erhöhung des Risikos für die spätere Asthmaentwicklung. Dabei spielt nicht nur die Viruspersistenz im Respirationstrakt, sondern auch eine genetisch determinierte Neigung zur Ausprägung eines atopischen Phänotyps eine zentrale Rolle, da die Durchseuchungsrate für RS-Viren bei Kindern unter zwei Jahren bei nahezu 100% , die Asthmaprävalenz allerdings lediglich bei 10% liegt (Maziak et al., 2004). Andererseits scheinen wiederholte, viral bedingte Atemwegsinfektionen wie sie gehäuft in Kindertagesstätten auftreten einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines Asthma bronchiale zu haben (Juntti et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnten John et al. (2003) zeigen, dass Infektionen mit dem RS-Virus bei Patienten, die bereits an Asthma erkrankt waren, schwere Exazerbationen induzieren konnten.



# Relationship of Viral Infections to Asthma Pathogenesis



**Abbildung 1: Einfluss viraler Atemwegsinfektionen auf allergisches Asthma** (Quelle: Lemanske RF. Viral infections and asthma inception. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1023-6).

## 1.1.2 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Respirationstrakt, die nach der Klassifikation von Coombs und Gell als Typ I Reaktion eingestuft wird und aus einer Früh- und einer Spätreaktion besteht. Der Sofortreaktion vorangehend ist eine Sensibilisierung des Individuums gegenüber bestimmten Allergenen und die damit verbundene Synthese allergenspezifischer IgE-Antikörper. Nach der Inhalation eines Allergens wird dieses zunächst von im Respirationstrakt befindlichen, unreifen dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen und bewirkt somit durch die Veränderung der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle deren Differenzierung in reife DCs. Nach der Reifung wandern die dendritischen Zellen zu benachbarten Lymphknoten und präsentieren das prozessierte Allergen B- und T-Lymphozyten durch die Interaktion mit MHC-II, T-Zell-Rezeptor (TCR) und B-Zell-Rezeptor (BCR). Durch die Interaktion dieser Zellen und die An- bzw. Abwesenheit bestimmter co-stimulatorischer Moleküle und Cytokine wie z.B. IL-13 oder IL-4 kommt es zur Produktion und Sekretion von IgE. Dieses bindet an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI, der sich u.a. auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten und

Mastzellen befindet und bildet auf deren Oberfläche den membranständigen IgE-FcεRI-Komplex. Durch eine erneute Allergenexposition und die Interaktion des Allergens mit dem membranständigen IgE-FcεRI-Komplex kommt es zu einer Kreuzvernetzung verschiedener FcεRI-Moleküle. Dies setzt eine Signalkaskade in Gang, in deren Folge es zur Degranulation der Mastzelle bzw. des basophilen Granulozyten und zur Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatoren kommt. Die freigesetzten Mediatoren lösen schließlich die allergische Frühreaktion, die klinisch durch eine vermehrte Mucusproduktion und eine Atemwegsobstruktion charakterisiert ist, aus. Ferner führen die ausgeschütteten Mediatoren zu einer gesteigerten Vasodilatation, einem sogenannten capillary-leak, und damit zu einer massiven Plasmaextravasation in die Atemwege. Die Folge des Plasmaausstroms ist die Verdickung der Atemwegswand und ein damit verbundener, erhöhter Atemwegswiderstand, der die klinisch bestehende Dyspnoe weiter verstärkt.

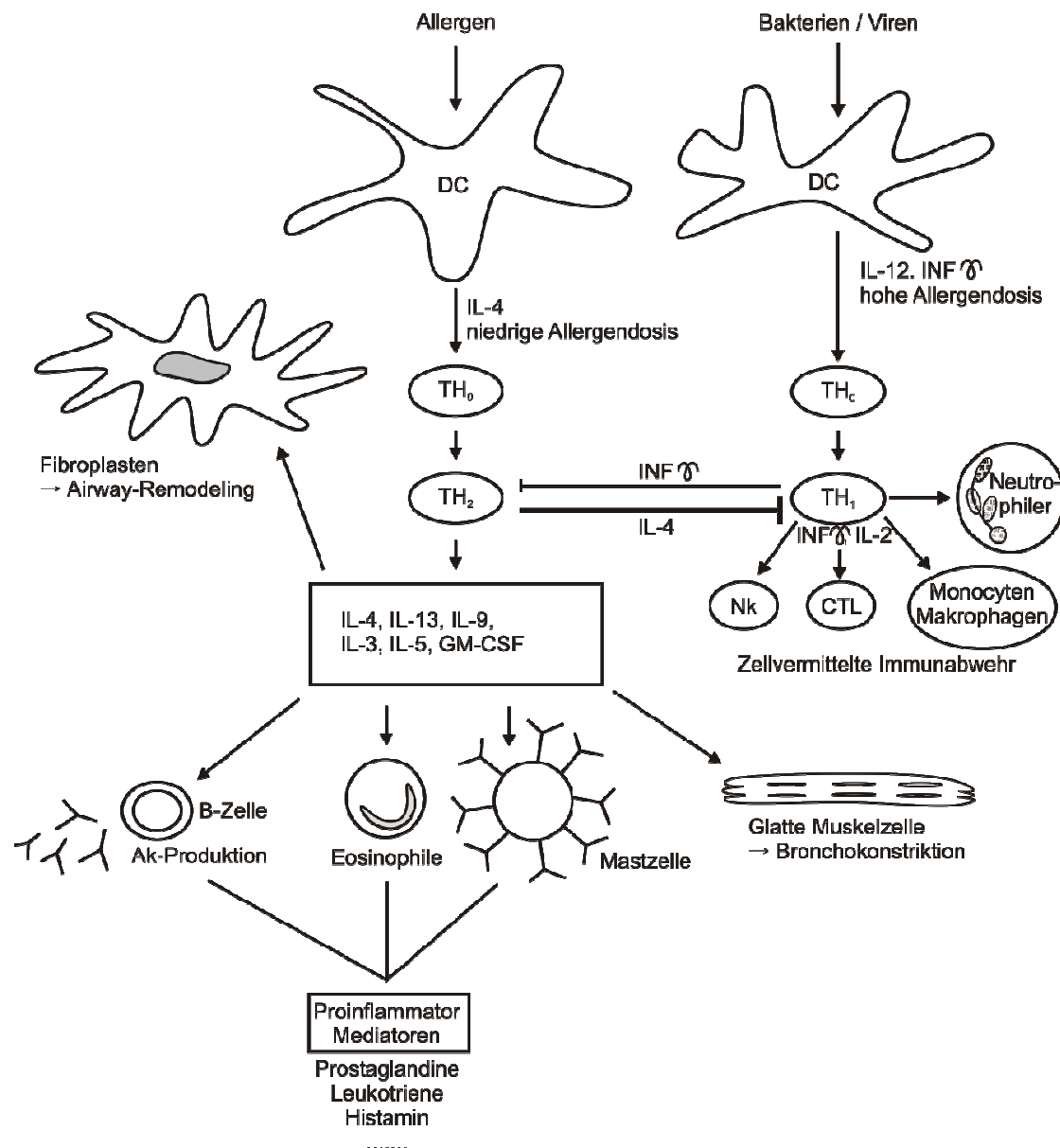
Die Spätreaktion findet 6-9 Stunden nach der eigentlichen Allergenprovokation statt und führt zur Infiltration und Aktivierung asthma-spezifischer Entzündungszellen wie z.B. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, eosinophiler Granulozyten oder Makrophagen. Die von diesen Zellen freigesetzten Mediatoren führen durch die Initiation von Umbauvorgängen im Respirationsepithel (Airway-Remodelling) zur Chronifizierung der Erkrankung.

#### **1.1.2.1 Rolle des TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>-Ungleichgewicht bei der Entwicklung des Bronchialasthma**

T-Helferzellen spielen bei der Induktion eines allergischen Asthma bronchiale eine zentrale Rolle. Innerhalb der Gruppe der T-Helferzellen lassen sich dabei zwei Subpopulationen, Typ 1- und Typ 2-T-Helferzellen (TH<sub>1</sub>-bzw. TH<sub>2</sub>-Zellen), unterscheiden, deren Einfluss auf die Entwicklung eines allergischen Asthmas als gegensätzlich zu bezeichnen ist.

Beide Zellsubpopulationen entwickeln sich in Abhängigkeit bestimmter exogener Faktoren aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der TH<sub>p</sub>-Zelle. Wird einer TH<sub>p</sub>-Zelle durch eine DC ein Antigen präsentiert, differenziert sie sich zu einer TH<sub>0</sub>-Zelle. Während sich TH<sub>1</sub>-Zellen unter der Anwesenheit hoher Allergendosen und der Zytokine IL-12 (Hsieh et al., 1993) und INFγ aus der TH<sub>0</sub>-Zelle entwickeln, erfolgt die

Differenzierung der TH<sub>0</sub>-Zelle zu TH<sub>2</sub>-Zellen durch die Anwesenheit niedriger Allergendosen und der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abbildung 2; Schmitt et al., 1990).



**Abbildung 2: TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>- Ungleichgewicht bei der Entstehung des allergischen Asthmas**

Bakterien und Viren können durch Induktion der angeborenen Immunität zur Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. INF $\gamma$  zur Differenzierung von TH<sub>1</sub>-Zellen aus TH<sub>0</sub>-Zellen führen. Allergene induzieren TH<sub>2</sub>-Zytokine und fördern somit die Differenzierung von TH<sub>2</sub>-Zellen. TH<sub>1</sub>-Zellen inhibieren die Differenzierung von TH<sub>2</sub>-Zellen und umgekehrt. Im Rahmen des allergischen Asthmas kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Zellen, zugunsten der TH<sub>2</sub>-Zellen und somit zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Mediatoren.

Da die TH-Effektorzellen ebenfalls  $\text{INF}\gamma$  und IL-4 oder IL-5 produzieren können, sind auch sie in der Lage die Differenzierung der  $\text{TH}_0$ -Zelle in eine bestimmte Richtung zu beeinflussen. So führt die Ausschüttung von  $\text{INF}\gamma$  nicht nur zur Differenzierung zum  $\text{TH}_1$ -Phänotyp, sondern auch zur Inhibition der  $\text{TH}_2$ - Zelldifferenzierung. Die Freisetzung von IL-4 führt umgekehrt durch Reduktion der Ansprechbarkeit von T-Zellen auf IL-12 zur verminderten Ausprägung des  $\text{TH}_1$ -Tells (Parronchie et al., 1992).

Da an vielen Prozessen der asthmatischen Reaktion die Leitzytokine der  $\text{TH}_2$ -Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 beteiligt sind, scheint es sich bei der Entwicklung des Asthma bronchiale um eine  $\text{TH}_2$ -gewichtete Immunreaktion zu handeln.

#### **1.1.2.2 Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf das allergische Asthma**

Die Infiltration der Atemwegsmucosa mit eosinophilen Granulozyten stellt ein charakteristisches Zeichen der asthmatischen Entzündungsreaktion dar. Auch im peripheren Blut und in bronchoalveolarer Lavageflüssigkeit lassen sich erhöhte Spiegel von eosinophilen Granulozyten nachweisen (Evans et al., 1996). Unter dem Einfluss der  $\text{TH}_2$ -Cytokine IL-5 und des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) erfolgt die Bildung und Reifung der Eosinophilen im Knochenmark. Reife eosinophile Granulozyten sind durch einen hohen Gehalt an potentiell proinflammatorischen Proteinen, wie z.B. dem Major Basic Protein (MBP), dem Eosinophile-Derived Neurotoxin (EDN) und verschiedener kationischer Proteine und Peroxidasen gekennzeichnet. Die primäre Funktion dieser basischen Proteine umfasst in erster Linie die Zytotoxizität auf Parasiten, Tumorzellen und Bronchialepithelien, wodurch sie entscheidend an der Zerstörung des Atemwegsepithels beteiligt sind. Durch die Sekretion von IL-5 im Sinne eines autokrinen Rückkopplungsmechanismus kommt es zur Inhibition der eigenen Apoptose und damit zu einer verlängerten Überlebenszeit der eosinophilen Granulozyten und in dessen Konsequenz zu einer prolongierten Entzündungsreaktion.

### **1.1.2.3 Einfluss von Mastzellen auf das allergische Asthma**

Mastzellen gehören zu den am längsten bekannten Effektorzellen des asthmatischen Inflammationsprozesses. Ihre IgE – vermittelte Degranulation bewirkt die Freisetzung der in präformierten Vesikeln gespeicherten Mediatoren, Prostaglandin D<sub>2</sub> und der Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub>. Neben der bronchokonstriktorisches Wirkung dieser Mediatoren kommt es als Resultat ihrer Freisetzung zu einer vaskulären Permeabilitätssteigerung, resultierend in Ödembildung, und zur Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen (Williams et al., 2000). Ferner tragen Mastzellen durch die Expression der Zytokine IL-5, IL-8, GM-CSF und TNF $\alpha$  zur Prolongation des Entzündungsprozesses bei und fördern so die asthmatische Spätreaktion. Dabei bleibt die eigentliche pathophysiologische Rolle der Mastzelle auf die asthmatische Frühreaktion beschränkt, welche klinisch durch akute Dyspnoe imponiert, der weitere Verlauf der Entzündung wird auf zellulärer Ebene vor allem durch Eosinophile, Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten bestimmt (Williams et al., 2000).

### **1.1.2.4 Einfluss von Alveolarmakrophagen auf das allergische Asthma**

Alveolarmakrophagen zählen zu wichtigsten immunmodulatorischen Effektorzellen des Alveolarraums und der luftleitenden Atemwege. Durch den ständigen Kontakt des Atemwegsepithels mit einer Vielzahl an Mikroben, Toxinen und Antigenen erklärt sich die Notwendigkeit einer effektiven, primären Verteidigungslinie.

Alveolarmakrophagen differenzieren sich aus Monozyten, sind wichtig für die Aufrechterhaltung der pulmonalen Gewebemöostase, kontrollieren die T-Zell-Proliferation und sind an der Antigenpräsentation beteiligt (Holt et al., 1985). Sie exprimieren verschiedene Oberflächenmoleküle CD68, CD23, CD14, den MHC-II-Rezeptor, sowie verschiedene Zytokinrezeptoren. Durch die Interaktion eines Allergens mit einem geeigneten Rezeptormolekül auf der Zelloberfläche der Alveolarmakrophagen wird eine Kaskade in Gang gesetzt in deren Folge es zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und GM-CSF kommt, wohingegen die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie die von IL-10 vermindert wird (Holgate et al., 1997; Hallsworth et al., 1994).

#### **1.1.2.5 Einfluss von Atemwegsepithelzellen auf das allergische Asthma**

Das Atemwegsepithel stellt die Grenzfläche zwischen der Außenwelt und dem organspezifischen Lungengewebe dar und spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der pulmonalen Gewebshomöostase. Unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung zeigt sich bei Asthmatikern eine Schädigung des Atemwegsepithels und damit eine Unterbrechung der physiologischen Barriere zwischen Umwelt und Organismus. Durch die Freisetzung von Mediatoren und die Expression von Adhäsionsmolekülen fördern Epithelzellen die Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten und tragen somit auch zur Aktivierung der Entzündungsreaktion bei (Montefort et al., 1993; Vignola et al., 1994).

#### **1.1.2.6 Einfluss von Atemwegsmyozyten auf allergisches Asthma**

Die Rolle der glatten Muskelzellen beim allergischen Asthma ist bisher nicht hinreichend geklärt. Allerdings konnten morphometrische Studien wie die von Ebina et al. (1990) eine Zunahme der glatten Muskulatur in den kleinen Atemwegen von Asthmapatienten nachweisen, deren histologische Aufarbeitung eine Einteilung der Asthmapatienten in zwei Typen, Typ I und Typ II – Asthmatiker, ermöglichte. So ist die Zunahme der Muskelmasse der Bronchien bei Typ I Asthmatikern durch Hyperplasie verursacht und lediglich auf die großen Bronchien beschränkt, wohingegen sie bei Typ II Asthmatikern durch Hypertrophie bedingt ist und sich auf das gesamte Bronchialsystem ausdehnt (Ebina et al., 1993). Durch den Nachweis der Expression von RANTES, IL-8, GM-CSF konnten sowohl John et. al (1997,1998) als auch Saunders et al. (1997) das Synthesepotential glatter Atemwegsmuskelzellen belegen. In Zellkulturen konnte unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine ein Wechsel von der Kontraktilität zur Synthese beobachtet werden, was wiederum zur Hypothese der Phänotypplastizität von Bronchialmyozyten, d.h. dem reversiblen Übergang vom kontraktilen in den synthetischen Aktivitätszustand, führte (Hirst et al., 1996). Durch diesen Vorgang, der in der Verdickung der Atemwegswand und somit der Erhöhung des Atemwegswiderstands resultiert, tragen die glatten Muskelzellen wesentlich zum Umbau des Atemwegsystems, dem so genannten Airway Remodelling bei.

## 1.2 Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind Proteine, die die intrazelluläre Signalübertragung vermitteln. Sie werden von verschiedenen Zelltypen meist nach deren Stimulation durch Allergenkontakt exprimiert und entfalten ihre Wirkung durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen (Loppnow, 2001). Zytokine vermitteln die Signaltransduktion vorrangig parakrin, d.h. zwischen benachbarten Zellen. Im Rahmen autokriner Mechanismen sind sie allerdings auch in der Lage ihre eigene Produktion in entsprechenden Zelltypen zu regulieren, was z.B. zur Prolongation einer allergischen Reaktion führen kann.

1986 wurden erstmalig T-Zell-Subpopulationen, TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Zellen, beschrieben, die sich durch die von ihnen produzierten Zytokine unterscheiden (Mosmann et al., 1986).

So produzieren TH<sub>1</sub>-Zellen INF $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$  und sind essentiell für die Abwehr viraler und fungaler Infektionen, die Fremdgewebeerkennung (Transplantatabstoßung), sowie die Zerstörung neoplastischer Zellen. TH<sub>2</sub>-Zellen werden durch die Produktion der Interleukine 4, 5, 10 und 13 charakterisiert und zeichnen sich durch die durch IgE, Mastzellen und eosinophile Granulozyten vermittelten Effekte aus, die hauptsächlich bei der Abwehr von Parasiten und der Ausprägung von Allergien zum Tragen kommen (Janeway et al., 1995).

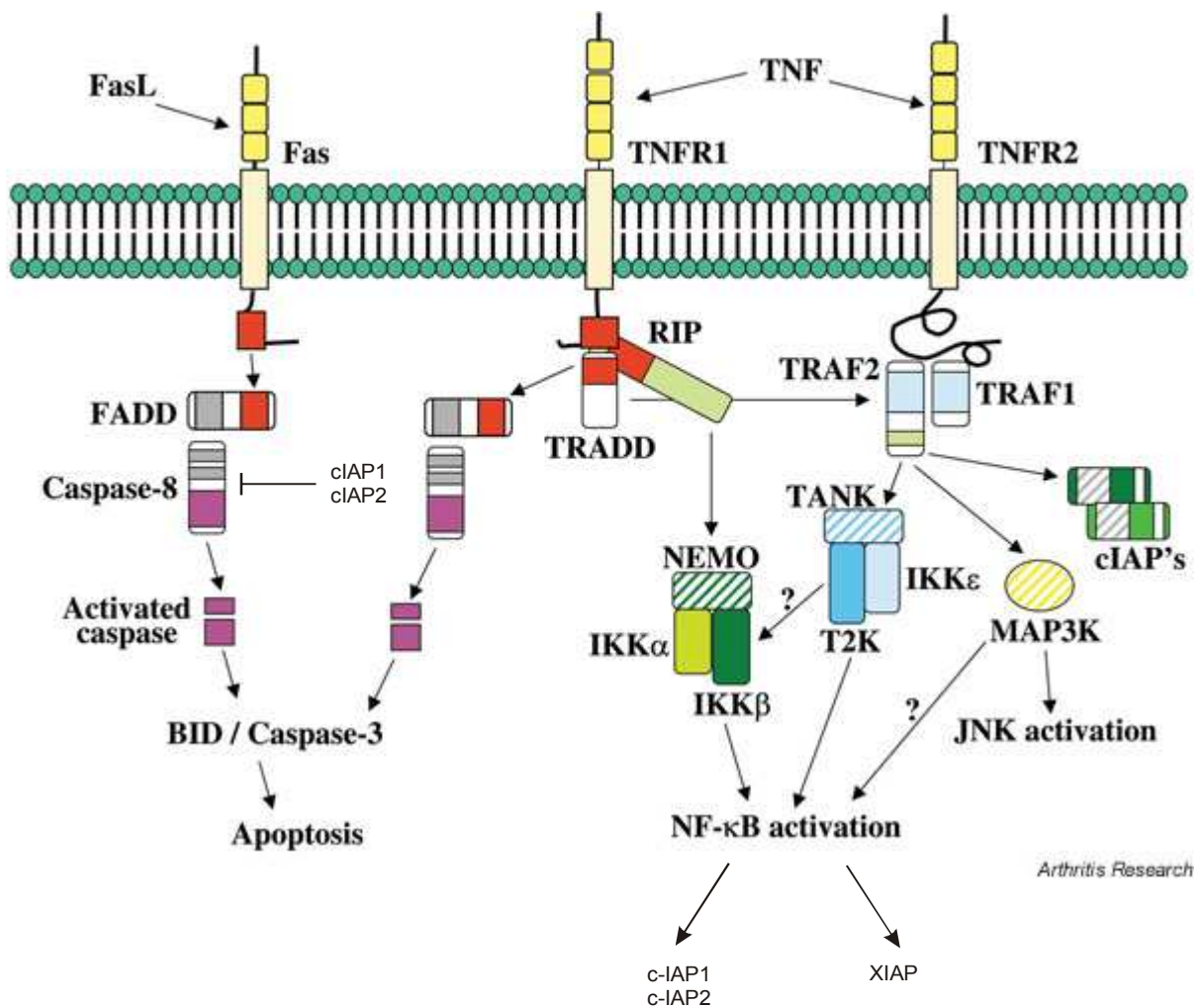
### 1.2.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF-Rezeptor 1 und 2

TNF $\alpha$  ist ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin, welches u.a. von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen produziert wird (Baud et al., 2001). Es wird als ein 26 kDa großes, transmembranäres Homotrimer auf der Zelloberfläche exprimiert und kann durch den Verdau der Metalloprotease TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) von der Zelloberfläche abgespalten und in die ebenfalls biologisch aktive, 17 kDa große, lösliche Form überführt werden (Idriss et al., 2000). TNF $\alpha$  aktiviert und induziert die NO-Synthese der Makrophagen, aktiviert das Gefäßendothel und führt zur einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zu einem vermehrten Einstrom von IgG und Komplement, sowie einer gesteigerten Lymphdrainage führt (Janeway et al., 1995). In Abhängigkeit von Zelltyp und aktuellen physiologischen Bedingungen kann die Stimulation mit TNF $\alpha$  zu völlig verschiedenen,

z.T. konträren Konsequenzen führen, d.h. TNF $\alpha$  kann sowohl Apoptose als auch Zelldifferenzierung und Proliferation induzieren (Hehlhans et al., 2005). Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und die damit verbundene Induktion der Genexpression weiterer proinflammatorischer Zytokine, kommt TNF $\alpha$  eine zentrale Rolle bei der Initiierung entzündungsfördernder Immunantworten zu (Aggarwal, 2003). Im Rahmen der asthmatischen Reaktion wird TNF $\alpha$  von Mastzellen und Makrophagen freigesetzt und dient der Rekrutierung von neutrophilen, sowie eosinophilen Granulozyten durch die Stimulation von Fibroblasten zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM oder VCAM (Choy et al., 2001; Thomas, 2001). Seine vielfältigen Funktionen erfüllt TNF $\alpha$  durch die Aktivierung der beiden zur TNF - Rezeptor - Superfamilie gehörenden Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 (Hehlhans et al., 2005).

Der TNF-R1 ist ein 55 kDa großes, trimerisiertes Typ I-Transmembranprotein, welches intrazellulär über eine Protein-Protein-Interaktionseinheit, die sogenannte Todesdomäne verfügt. Die Bindung des trimeren Liganden TNF $\alpha$  führt zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Teils des TNF-R1 (Chen et al., 2002) durch die die Rekrutierung weiterer Adaptermoleküle wie beispielsweise TRADD (TNF-receptor associated death domain protein), einem zentralen Weichensteller in der Signalkaskade des TNF-R1, an die Todesdomäne ermöglicht wird. Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, wird durch die Bindung von FADD (Fas-assoziierte Todesdomäne) an TRADD Caspase 8 aktiviert und somit die apoptotische Wirkung von TNF $\alpha$  vermittelt. Durch Interaktion von TRADD mit TRAF-2 (TNF-receptor associated factor 2) und der Serin-Threonin-Kinase RIP-1 (receptor interacting protein 1) kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung des Proteinkinase-Komplexes IKK (Inhibitor des NF $\kappa$ B-Inhibitors), in dessen Folge es zu einer Disinhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B kommt, welcher nach Trans-lokation in den Zellkern zum einen die Genexpression der antiapoptotischen Faktoren cIAP1, cIAP2 und XIAP, sowie verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle steigert und zum anderen durch eine Erhöhung der Calciumsensitivität an den Myofilamenten glatter Atemwegsmuskelzellen, sowie die Erhöhung des intrazytoplasmatischen Calciumspiegels zu einer gesteigerten bronchialen Hyperreagibilität führt (Kazuyoshi et al., 2000; Amrani et al., 2000).





**Abbildung 3: TNF- $\alpha$  - Signalkaskade via TNFR1 und TNFR2**

Aktivierung von TNFR1 führt über die Interaktion der Adaptermoleküle TRADD bzw. TRAF2 mit der Todesdomäne (RIP) zur Aktivierung der Caspasenkaskade und damit zur Apoptoseinduktion. Über die Aktivierung von TNFR2 erfolgt die Aktivierung von NF $\kappa$ B und darüber die verstärkte Transkription proinflammatorischer, die Caspasen hemmender Zytokine (c-IAP1, c-IAP2).

BID, beta interaction domain; cIAPs, cellular inhibitors of apoptosis; FADD, Fas-associated death domain protein; IKK, I $\kappa$ B kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP3K, mitogen-activated protein 3 kinase; NEMO, NF- $\kappa$ B essential modulator protein; RIP, receptor-interacting protein; T2K, TRAF2-associated kinase; TANK, TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator; TRADD, TNF receptor-associated death domain protein; TRAF, TNF receptor-associated factor.

(Quelle: Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. Arthritis Res 2002; 4:243-252)

Während der TNF-R1 bis auf wenige Ausnahmen, wie beispielsweise Erythrozyten, auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv exprimiert wird, findet sich der TNF-R2 hauptsächlich auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems, wo seine Expression

streng reguliert wird (Aggarwal, 2003). Auch unterscheiden sich beide Rezeptoren bezüglich ihrer Affinität gegenüber löslichem und membrangebundenem TNF $\alpha$ . Während TNF-R1 sowohl von löslichem als auch von membrangebundenem TNF $\alpha$  aktiviert wird, führt nur die Bindung von membrangebundenem TNF $\alpha$  zur vollständigen Aktivierung von TNF-R2 (Grell et al, 1995).

Ferner verfügt TNF-R2 nicht über eine Todesdomäne (Wajant et al., 2003), vielmehr übt er seine Funktion über die Rekrutierung verschiedener Proteine, wie z.B. Tumornekrosefaktor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2), aus und führt letztlich unter anderem durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der damit verbundenen verstärkten Transkription proinflammatorischer Zytokine, der verstärkten Expression antiapoptotischer Moleküle (c-IAP1, c-IAP2, XIAP), sowie der erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) zu einer vermehrten Einwanderung inflammatorischer Zellen ins Lungengewebe, sowie durch die Induktion der Fibroblastenproliferation zu verstärkten strukturellen Umbauprozessen im Bereich der Atemwege (Airway-Remodelling).

### **1.2.2 Interleukin-5 und Interleukin-5-Rezeptor**

Bei Interleukin-5 (IL-5) handelt es sich um ein 40-45 kDa großes Glykoprotein, welches hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten, aber auch von NK-Zellen, B-Lymphozyten, Eosinophilen sowie Mastzellen produziert wird. Es stimuliert das Wachstum, die Differenzierung, die Freisetzung sowie die Effektorfunktion der eosinophilen Granulozyten und spielt dadurch eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Eosinophilie (Rothenberg, 1998). Ferner führt IL-5 neben der Aktivierung auch zu einer verstärkten Migration und Infiltration Eosinophiler in die Bronchialschleimhaut (Walsh et al., 1990).

Vermittelt werden die vielfältigen Effekte des IL-5 durch den heterodimeren, aus einer für IL-5-spezifischen, niedrig affinen  $\alpha$ - und einer nicht bindenden  $\beta$ -Kette bestehenden IL-5-Rezeptor. Die IL-5- $\alpha$ -Kette wird hauptsächlich auf der Zelloberfläche Eosinophiler und Basophiler, nicht aber auf der Oberfläche von Neutrophilen oder Monozyten (Lopez et al., 1991) exprimiert. Etwa 90% des IL-5R $\alpha$  befinden sich in der löslichen (inaktiven) Form, wohingegen sich lediglich 10% in der membrangebundenen (aktiven) Form befinden (Tavernier et al., 1991). Nach Bindung von IL-5 an seinen Rezeptor auf

der Oberfläche eosinophiler Granulozyten kommt es zur Aktivierung der JAK2 sowie STAT-1 $\alpha$ /STAT5-abhängigen Signaltransduktionskaskade in deren Folge es zur verstärkten Expression von IL-5-mRNA und folglich auch zu erhöhten IL-5-Serumspiegeln kommt (Pazdrak et al., 1995).

### **1.2.3 Interleukin 4 und Interleukin-4-Rezeptor $\alpha$**

IL-4 spielt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung naiver T-Zellen: einerseits fördert es die Differenzierung von TH<sub>0</sub>-Zellen zu TH<sub>2</sub>-Zellen, die wiederum selbst IL-4 produzieren, andererseits wirkt es gleichzeitig mit IL-10 und IL-13 inhibierend auf die Entwicklung von TH<sub>1</sub>-Zellen. IL-4 stimuliert die Proliferation sowie die Differenzierung von B-Lymphozyten, die Expression von MHC-II-Molekülen und ist entscheidend an der Umschaltung der Immunglobulinproduktion auf IgE und IgG1 beteiligt (Kimura et al, 2000; Paul WE, 1991). Ferner induziert IL-4 auf Endothelzellen die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) und ermöglicht somit die Transmigration von eosinophilen Granulozyten in das entzündliche Gewebe (Schleimer et al, 1992). Ferner inhibiert IL-4 die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Makrophagen und Monozyten, begünstigt aber gleichzeitig die Antigenpräsentation durch diese Zellen und fördert somit die humorale Immunantwort.

Vermittelt werden diese vielfältigen Funktionen von IL-4 über den IL-4-Rezeptor (IL-4R), der als Typ I, bestehend aus der IL-4R $\alpha$ -Kette und einer  $\gamma$ -Kette, auf hämatopoetischen Zellen und als Typ II, bestehend aus einer IL-4R $\alpha$ -Kette und der  $\alpha$ -Kette des IL-13-Rezeptor, auf endothelialen und epithelialen Zellen vorkommt ( Mowen et al., 2004). Die Bindung von IL-4 an die hochaffine Bindungsstelle IL-4R $\alpha$  führt zur Rezeptordimerisierung und initiiert dadurch eine über Januskinasen (JAKs) und STATs (signal transducers and activators of transcription) vermittelte Signaltransduktionskaskade, in deren Konsequenz es zu einer verstärkten Expression von IL-4 und somit zu einer verstärkten Differenzierung von TH<sub>2</sub>-Zellen kommt (Mowen et al., 2004).

### 1.2.4 Interleukin 13 und Interleukin-13-Rezeptor $\alpha 1$ und $\alpha 2$

Das mit IL-4 verwandte, 17 kDa große Glycoprotein Interleukin 13 (IL-13) wird hauptsächlich von aktivierten  $CD4^+$ - $TH_2$ -Zellen, aber auch von NK-Zellen, Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen und IgE-sensibilisierten glatten Muskelzellen der Atemwege gebildet (Akbari et al., 2003). IL-13 ist direkt an der Induktion und Aufrechterhaltung allergischer Reaktionen beteiligt, in dem es in B-Lymphozyten den Isotypenwechsel zu IgE fördert und zusätzlich die Proliferation aktivierter B-Zellen einleitet. Weiterhin fördert IL-13 die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie z.B. VCAM-1, MCP 1-5 (monocyte chemoattractant protein), Eotaxin1 und Eotaxin 2, was das vermehrte Einwandern proinflammatorischer Zellen ins entzündliche Gewebe erleichtert (Lukacs et al, 2001; Zhu Z et al., 2002; Schuh et al., 2003; Zimmermann et al., 2003). Durch die Induktion verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), z.B. MMP2 und MMP9, die durch proteolytische (In-)Aktivierung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren Einfluss auf den Entzündungsverlauf innerhalb des Gewebes nehmen, moduliert IL-13 die allergische Reaktion (Zheng T et al., 2000). Des Weiteren trägt IL-13 u.a. durch Induktion und Aktivierung des profibrotischen Mediators TGF $\beta$  (Lee CG et al., 2001), durch direkte Stimulation von Myofibroblasten (Ingram JL et al., 2003) sowie durch Hochregulation des Enzyms Arginase I, das L-Arginin u.a. zu L-Ornithin, dem wichtigsten Metaboliten bei der Kollagensynthese durch Fibroblasten, zu verstärkter subepithelialer Fibrose des Aveolarraums bei (Hesse M et al., 2001; Zimmermann et al., 2003). Weiterhin nimmt IL-13 Einfluss auf die ebenfalls für Asthma bronchiale pathognomonische Mucushypersekretion: zum einen induziert IL-13 die Proliferation von Epithelzellen über einen EGF-R/TGF $\alpha$ -abhängigen Mechanismus und unterstützt gleichzeitig die Transformation des eigentlich absorbierenden in ein sezernierendes Bronchialepithel, indem es über einen STAT6-abhängigen Mechanismus zum Verlust Amilorid-sensitiver Kanäle und zur Erhöhung von  $Ca^{2+}$ -sensitiven anionischen Kanälen führt (Danahay et al., 2002), zum anderen führt die Inhibition der Expression des "forkhead box a2 transcription factor" zu einer spontanen Becherzellhyperplasie (Wan H et al., 2003). Auch die ebenfalls IL-13-abhängige, verstärkte Expression des Gens hCLCA1/mCLCA3, das für einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Chloridkanal kodiert, trägt zu einer bei Asthmatikern erhöhten Mucushypersekretion bei (Zhou Y et al., 2001). Des

Weiteren trägt IL-13 durch Verstärkung des bradykinin-, histamin- und acetylcholin-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in glatte Atemwegsmuskelzellen (Moore PE et al., 2002), durch die Inhibition der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase und den damit einhergehenden verminderten Spiegeln des Bronchodilatators NO (Meurs H et al., 2002) sowie die Erhöhung der Produktion des bronchokonstriktorischen Komplementfaktors C3a (Dienger KM et al., 2002) zu einer vermehrten bronchialen Hyperreagibilität bei. Vermittelt werden die vielfältigen proinflammatorischen Funktionen dieses Interleukins über Bindung an den mit IL-4R $\alpha$  assoziierten Interleukin-13-Rezeptor  $\alpha 1$  (IL-13R $\alpha 1$ ), und die daraus resultierende Aktivierung des JAK/STAT6-Signaltransduktionsweges, in dessen Konsequenz es zu einer TH<sub>2</sub>-gewichteten Immunantwort kommt (Graber P et al., 1998).

IL-13R $\alpha 2$  bindet IL-13 mit im Vergleich zu IL-13R $\alpha 1$  100-300-facher Affinität (Rahaman SO et al., 2002) und fördert die Internalisierung des Liganden, allerdings kommt es zu keiner STAT6-vermittelten Signalübertragung, sondern vielmehr zu einer Abschwächung des STAT6-Signals. Ferner konnte durch Rahaman et al. (2002) gezeigt werden, dass die kurze zytoplasmatische Domäne des IL-13R $\alpha 2$  die kurze zytoplasmatische Domäne von IL-4R $\alpha$  bindet und somit sowohl IL-13 als auch IL-4-abhängige Signalwege hemmt. Daines et al. (2002) zeigten, dass es sich bei IL-13R $\alpha 2$  hauptsächlich um ein intrazelluläres Molekül handelt, dessen Oberflächenregulation hauptsächlich durch INF $\gamma$  verstärkt wird. Zhu et al. (2002) konnten zeigen, dass der IL-13R $\alpha 2$  durch seine IL-13-bindende Wirkung als eine Art Lockvogelrezeptor fungiert, aus dessen Aktivität sowohl eine verminderte Mucushypersekretion wie auch eine verminderte bronchiale Hyperreagibilität resultiert.

### **1.2.5 Interleukin-10 und Interleukin-10-Rezeptor $\alpha$ und $\beta$**

Interleukin 10 (IL-10) ist ein 18 kDa großes, nicht-glykolisiertes Protein, welches von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Keratinozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen produziert wird. Die biologisch aktive Form von IL-10 ist ein aus zwei nicht-kovalent gebundenen Einheiten bestehendes Homodimer. Die Hauptfunktion von IL-10 besteht in seiner immunsuppressiven Wirkung, die es durch die Inhibition der von Makrophagen und Monozyten gebildeten proinflammatorischen Zytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) und Chemokine entfaltet. Gleichzeitig reduziert IL-10 die Expression von MHCII-

Molekülen und der costimulatorischen Moleküle CD 80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), was zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen und somit zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine führt. Somit ist IL-10 ein starker Inhibitor der antigenvermittelten T-Zell-Antwort. Des Weiteren wirkt IL-10 aktivierend auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, indem es ihre Proliferation und Zytotoxizität steigert. Zusätzlich fördert IL-10 durch Induktion des antiapoptotischen Gens bcl-2 das Überleben von B-Zellen und führt zu einer verstärkten Antikörperbildung durch diese Zellen. Auch bewirkt es einen Isotypenswitch, allerdings resultiert dieser in einer verminderten Bildung von IgE (Moore et al., 2001; Punnonen et al., 1993). Ferner inhibiert IL-10 die Produktion von INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  durch NK-Zellen und induziert die Lyse infizierter Zellen (Mocellin et al., 2004).

Die von IL-10 vermittelten Effekte werden durch Bindung des Zytokins an den aus zwei IL-10R $\alpha$ - und zwei IL-10R $\beta$ -Einheiten bestehenden, vier Transmembrandomänen enthaltenden IL-10-Rezeptorkomplex vermittelt (Liu et al., 1994). Durch Bindung von IL-10 an die hochaffine IL-10R $\alpha$ -Untereinheit kommt es zur Aktivierung JAK/STAT-Signaltransduktionsweges, in dessen Konsequenz u.a. die Transkription der "Suppressor of Cytokine Signalling"-Gene SOCS-1 und SOCS-3, physiologischen Inhibitoren von INF $\gamma$ , IL-10 und IL-4, aktiviert wird (Moore et al., 2001).

### 1.3 Bedeutung des Surfactant beim allergischen Asthma

Der Begriff Surfactant leitet sich von **surface active agent** ab und bezeichnet ein in Alveolen gebildetes, die Oberflächenspannung herabsetzendes Substanzgemisch. Es besteht zu 90% aus Lipiden und lediglich zu 10% aus funktionell wichtigen Proteinen. Die Lipide ihrerseits bestehen zu 90% aus verschiedenen Phospholipiden, wobei die Phosphatidylcholinfraktion mit nahezu 80% den Hauptanteil trägt. Die Phospholipide sind durch ihren amphipathischen Charakter ausgezeichnet, der dafür sorgt, dass sich die Phospholipidmoleküle aus energetisch günstigen Gründen in die Luft-Flüssigkeitsgrenze einlagern, wobei das lipophile Ende in Richtung Luft weist, während das hydrophile Ende in Richtung Flüssigkeit ragt. Auf diese Weise wird die Oberflächenspannung im Bereich des Atemwege gesenkt und die notwendige Arbeit zur Vergrößerung der Oberfläche während der Inspiration reduziert. Der 10%-ige Proteinanteil besteht zu 8% aus Serumproteinen und zu 2% aus surfactantspezifischen

Proteinen. Diese surfactantspezifischen Proteine sind essentiell für die Surfactantfunktion, da sie nicht nur durch die Interaktion mit den Phospholipiden die Oberflächenspannung deutlich reduzieren, sondern auch an der Surfactantsynthese und –metabolisierung und an der Abwehrfunktion beteiligt sind. Allgemein differenziert man vier verschiedene Surfactantproteine (SP), die mit den Buchstaben A bis D (SP-A bis SP-D) bezeichnet werden. Die lipophilen Proteine SP-B und SP-C tragen hauptsächlich zur Reduktion der Oberflächenspannung bei, wohingegen die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D eher regulative und immunmodulierende Eigenschaften aufweisen.

Hauptproduktionsort der Surfactantproteine ist der TypII-Pneumozyt. Ferner erfolgt eine zusätzliche Produktion in den Clarazellen.

Surfactant unterstützt unspezifische Abwehrmechanismen, z.B. durch die Fähigkeit von SP-A und SP-D spezifische Erreger zu binden, kann die Funktion von Alveolarmakrophagen und Granulozyten verändern und besitzt immunmodulierende Einflüsse auf Lymphozyten.

### **1.3.1 Bedeutung von Typ-II-Pneumozyten auf Surfactantmetabolismus und allergisches Asthma**

Das Bronchialsystem endet nach 16-18 dichotomen Verzweigungen im Bereich der Alveolen, welche einen Durchmesser von 0,2-0,6 mm aufweisen und in ihrer Gesamtheit eine Gasaustauschfläche von ca. 80 m<sup>2</sup> in Expiration und 120 m<sup>2</sup> in Inspiration umfassen. Ausgekleidet werden die Alveolen von zwei verschiedenen Epithelarten: Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten (White et al., 2002).

Typ-I-Pneumozyten (Deckzellen) bedecken mit ihrem organellenarmen Zellkörper etwa 95% der Alveolaroberfläche. Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der alveolären Flüssigkeitshomöostase sowie der Regulation von Proliferation, Peptidmetabolismus und Ionentransport zugeschrieben (Johnson et al., 2002).

Die verbleibenden 5% der Alveolarwand werden von den ca. 9 µm großen Typ-II-Pneumozyten, die etwa 15% aller Lungenparenchymzellen ausmachen, bedeckt. Im Gegensatz zu den Typ-I-Pneumozyten sind sie sehr organellenreich, was auf eine hohe Syntheseleistung schließen lässt. In ihrem rauen endoplasmatischen Retikulum werden alle Surfactantbestandteile synthetisiert, zusammen mit spezifischen Proteinen über den Golgi-Apparat in die Lamellarkörperchen transportiert und dort als zellulärer Surfactant

gespeichert. Nach Stimulation der Typ-II-Pneumozyten werden die Lamellarkörperchen ins Alveolarlumen exozytotisch freigesetzt und bilden an der Zelloberfläche tubuläres Myelin, aus dem an der Luft-Wasser-Grenze durch strukturelle Umwandlung aktiver Surfactant entsteht. Neben der Synthese und Sekretion von Surfactant sind Typ-II-Pneumozyten auch an der Bildung verschiedener immunmodulatorischer Stoffe wie z.B. Lysozym, Kathepsin H oder apoptose-induzierender Membranrezeptoren beteiligt, wodurch ihnen u.a. eine wichtige Aufgabe in der angeborenen Immunantwort zuteil wird. Eine weitere Aufgabe der Typ-II-Pneumozyten besteht in der Regeneration geschädigter Alveolarzellen, da sie, anders als Typ-I-Pneumozyten, über das Potential verfügen, sich in Deckzellen zu transformieren (Fehrenbach, 2001).

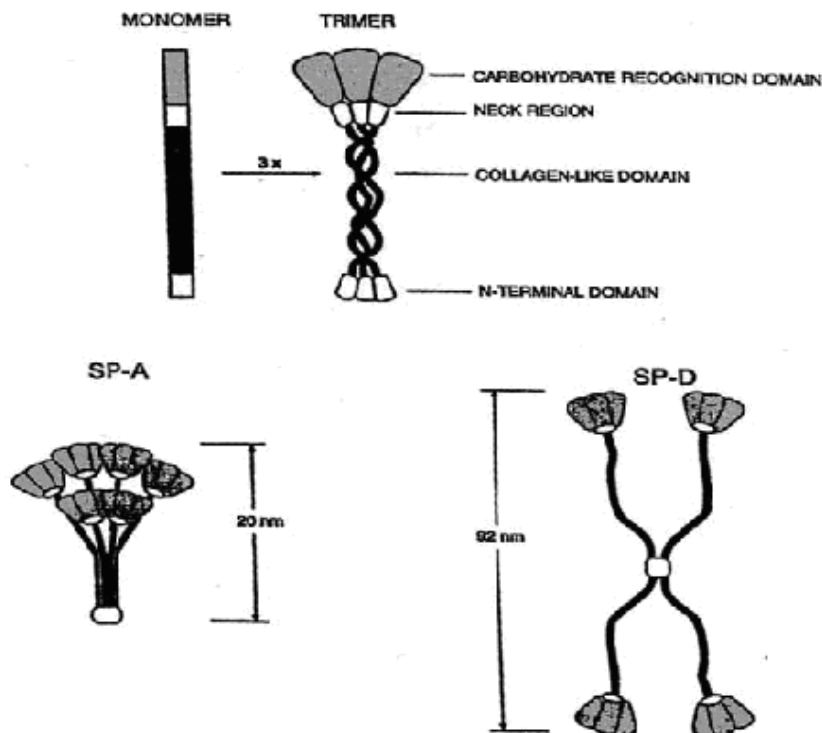
### **1.3.2 Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine SP-A und SP-D**

Die beiden hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D gehören wie Mannan-bindendes Lectin (MBL), bovines Conglutinin Collectin-43 (CL-43) zur Familie der Kollektine. Intrastrukturell weisen die Kollektinmonomere zum einen einen Lektinanteil auf, mit dem sie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Kohlenhydratsequenzen (carbohydrate recognition domain, CRD) erkennen und binden können, und zum anderen beinhalten sie eine kollagenähnliche Domäne, eine  $\alpha$ -helikale Verbindungsdomäne (Halsregion) sowie eine kurze N-terminale, glycinreiche Disulfiddomäne (Crouch et al., 2001). Jeweils drei dieser Monomere sind zu einem Trimer vereinigt.

SP-A besteht aus 18 ungefähr 26-36 kDa großen, einzelnen Monomeren, welche hexamerisieren und sich über die Kollagendomäne zu einer Art Blumenstrauß zum polymeren SP-A organisieren (Abbildung 4).

Das polymere SP-D besteht aus 12, zirka 43 kDa großen Monomere, wobei hier drei Monomere trimerisieren und sich vier dieser Trimere zu einem kreuzartigem SP-D-Polymer organisieren (Abbildung 4).





**Abbildung 4: Struktur von SP-A und SP-D**

Eine Trimer-Einheit besteht aus einer Kohlenhydratbindungsstelle (CRD), einer Halsdomäne (neck region), einer kollagenähnlichen Region und einer kurzen N-terminalen Disulfidomäne. SP-A besteht aus sechs Trimeren und ist blumenstraußähnlich organisiert, während SP-D aus vier, kreuzähnlich organisierten Trimeren besteht.

Quelle: Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins; functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129: 91-108)

SP-A und SP-D werden in der Lunge von Typ-II-Pneumozyten und Clarazellen gebildet. Während SP-D hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum gefunden wird, befindet sich SP-A größtenteils in lamellären Einschlüssen in Typ-II-Pneumozyten oder als an tubuläres Myelin gebundenes Protein im Alveolarraum (Madsen et al., 2000). Zusätzlich können die beiden Proteine in nahezu allen Epithelien anderer innerer Organe nachgewiesen werden (van Roozendaal et al., 2001).

### **1.3.3 Funktion der Surfactantproteine A und D und deren Rolle beim allergischen Asthma**

Beide Surfactantproteine sind über ihre CRDs in der Lage eine Vielzahl von Viren, Bakterien, Pilzen, Lipopolysacchariden und Allergen zu binden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ihre Hauptfunktion in der angeborenen, unspezifischen Abwehr liegt (Crouch et al., 2001; Reid et al., 1998). Sowohl SP-A als auch SP-D interagieren über spezifische Bindungsstellen mit Alveolarmakrophagen, so dass deren Phagozytoseaktivität und Chemotaxis erhöht werden kann (Vaandrager et al., 2000). Zusätzlich ist neben der Beeinflussung von Phagozytoseaktivität und Chemotaxis auch die Verstärkung des sogenannten „respiratory burst“ durch SP-A und SP-D nachgewiesen, d.h. durch die Interaktion der beiden Surfactanproteine mit Makrophagen kommt es zu einer gesteigerten Produktion und Freisetzung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die die Elimination von Mikroorganismen fördern (Hickmann-Davis et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird die T-Zell-abhängige Immunantwort durch die inhibitorische Wirkung von SP-A und SP-D auf die Proliferation von T-Zellen und die Ausschüttung bestimmter Zytokine in der Weise moduliert, dass eine Überreaktion des Immunsystems verhindert wird (Vandraager et al., 2000).

Allerdings konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass beide Surfactantproteine eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Chronifizierung allergischer Lungenerkrankungen und damit auch einen wichtigen Einfluss auf Faktoren der erworbenen Immunität zu haben scheinen. So konnten Cheng et al. (2000) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) an Asthma erkrankter Personen höhere Spiegel an SP-A und SP-D nachweisen als sich in der Gruppe gesunder Kontrollpersonen bestimmen ließen.

Im Rahmen von Versuchen mit dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* konnte ferner gezeigt werden, dass BALB/c Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen eine verminderte Konzentration an SP-D in der BAL aufweisen. Daraus schlossen Atochina et al. (2003), dass zwar die Grundexpression von SP-D genetisch festgelegt ist und durch gleiche Allergen-induzierte Mechanismen determiniert wird, zwischen verschiedenen Mäusetypen allerdings Unterschiede bestehen. Zusätzlich wiesen die C57BL/6 Mäuse signifikant niedrigere IL-4 und IL-5 Konzentrationen in der BAL auf, was auf die erhöhten SP-D –Konzentration dieser Tiere zurückzuführen sein dürfte und

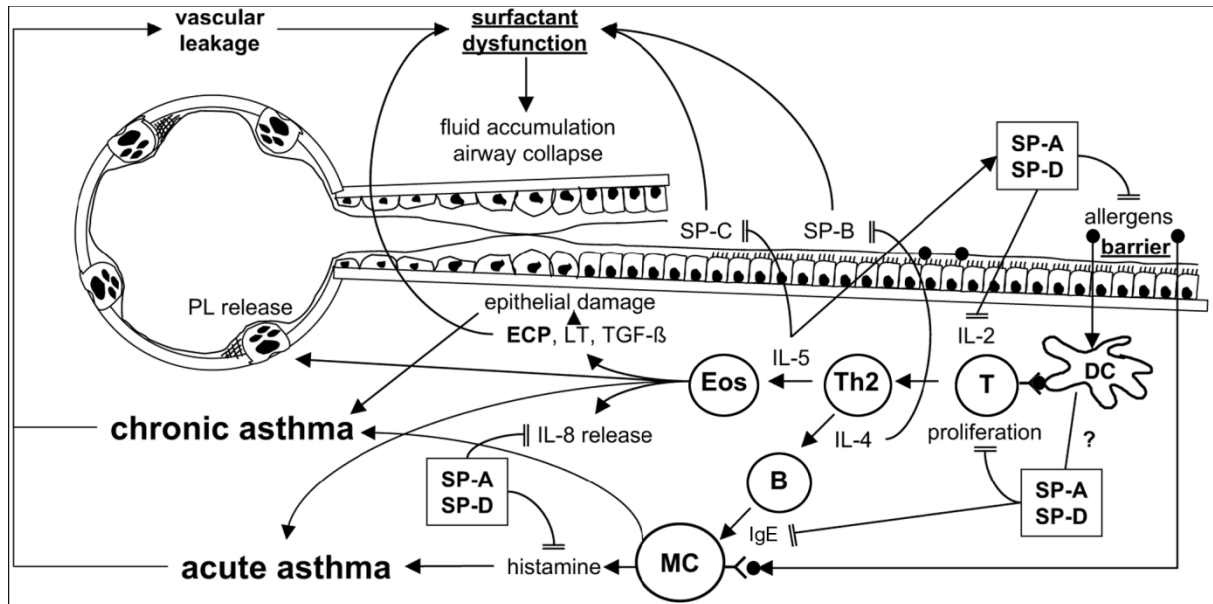
somit für den inhibitorischen Einfluss von SP-D bei der Entwicklung einer TH<sub>2</sub>-gewichteten Immunantwort spricht.

Letztlich nehmen SP-A und SP-D nicht nur Einfluss auf die Ausschüttung bestimmter Zytokine, auch umgekehrt kann die Expression dieser Surfactantproteine durch unterschiedliche Mediatoren verändert werden. So konnten z.B. Untersuchungen von Haczku et al. (2001) und Atochina et al. (2003) zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration des Serum-IgE-Spiegels und der SP-D-Konzentration besteht. Weitere Hinweise, dass zwar SP-D nicht aber SP-A im Rahmen eines allergischen Geschehens vermehrt gebildet wird, lassen sich aus den Daten von Cao et al. (2004) und Haczku et al. (2006) entnehmen. Beide konnten zeigen, dass eine vermehrte Bildung von SP-D durch IL-4 und IL-13, proinflammatorische Zytokine der TH<sub>2</sub>-gewichteten Immunantwort, nicht aber durch INF $\gamma$ , eine Zytokin der TH<sub>1</sub>-gewichteten Immunantwort, ausgelöst wird.

In früheren Arbeiten von Malhotra et al. (1993) und Wang et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass SP-A an wasserlösliche Bestandteile inhalativer Allergene (Pollen) bindet und deren Aufnahme durch Typ-II-Pneumozyten fördert und SP-D einen inhibitorischen Einfluss auf die allergen induzierte Histamin- und IgE-Freisetzung besitzt. Untersuchungen von Kishore et al. (2002) legen nahe, dass sowohl SP-A als auch SP-D eine wichtige antiinflammatorische Rolle in der Lunge spielen und den Organismus vor einer übersteigerten Immunreaktion bewahren, indem sie die Quervernetzung zwischen Allergen und Immunglobulin, die Freisetzung von Histamin, die Aktivierung von Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen und die Polarisierung von T-Helferzellen verhindern und die Aktivität von B- und T-Zellen, dendritischen Zellen und Alveolarmakrophagen modulieren.

Untersuchungen von Takeda et al. (2003) Alveolarmakrophagenkulturen zeigten, dass sowohl die Expression des antiinflammatorischen IL-10 als auch die INF $\gamma$ -Produktion, einem Mediator der TH<sub>1</sub>-gewichteten Immunantwort, durch SP-D gesteigert werden konnte. Ferner konnten in SP-D knock out Mäusen (SP-D<sup>-/-</sup>) höhere Spiegel des proinflammatorischen IL-13 sowie vermehrt eosinophile Granulozyten in der BAL nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass das Fehlen von SP-D die Entwicklung eines allergischen Habitus fördert. Durch Behandlung der Knock out Tiere mit SP-D und SP-A kam es zu einem Klassenwechsel von den initial proinflammatorischen TH<sub>2</sub>-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 zu Zytokinen der TH<sub>1</sub>-Immunantwort (Schaub et al., 2004). Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, wirken beide Surfactantproteine, A und D,

regulatorisch und gleichzeitig verknüpfend auf die erworbene und angeborene Immunität und stellen somit wichtige Parameter der Entstehung und Chronifizierung des Asthma bronchiale dar.



**Abbildung 5: Modulation des Entzündungsprozesses durch SP-A und SP-D**

Nach Aufnahme durch die Surfactantbarriere werden Allergene durch dendritische Zellen (DC) T-Zellen (T) präsentiert. Diese sezernieren IL-2, was die Differenzierung von Th2-Zellen fördert. Th2-Zellen sezernieren u.a. die proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-5, die Eosinophile (Eos) anziehen und B-Lymphozyten zur Produktion und Freisetzung von IgE stimulieren, welches an Mastzellen (MC) bindet und bei erneutem Allergenkontakt zur Freisetzung von Histamin und damit zu einem akuten Asthmaanfall führt. Aktivierte Eosinophile setzen Mediatoren wie das eosinophile kationische Protein (ECP), Leukotriene und TGF- $\beta$  frei, was zu Atemwegsepithelschäden und chronischer Atemwegsentzündung führt. Zusätzlich verursacht ECP Surfactantdysfunktion. Die vielfältigen immunmodulatorischen Funktionen von SP-A und SP-D sind in der Abbildung dargestellt.

Stimulation, Aktivierung und Freisetzung werden durch Pfeile gekennzeichnet; Inhibition und Herunterregulation sind durch Pfeile, die mit = abschließen, gekennzeichnet.

Quelle: Hohlfeld JM. The role of surfactant in asthma. Respir Research 2002, 3:4

### 1.3.4 Phänotyp von SP-D Knock out (SP-D<sup>-/-</sup>) Mäusen

Um die Funktion der Surfactantproteine in vivo zu untersuchen, wurden Studien mit Knock out Mäusen durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, wie wichtig SP-D zur Aufrechterhaltung einer normalen Lungenfunktion ist. Dabei zeigten SP-D<sup>-/-</sup> Mäuse erhebliche Abnormalitäten in Zellmorphologie und Surfactanthomöostase, d.h. das Fehlen des SP-D-Gens führte zu einer Hyperplasie von Typ-II-Pneumozyten, massiver Vergrößerung intrazellulärer Lamellarkörperchen, zur Anhäufung von Surfactant-

proteinen und Apoproteinen im Alveolarraum und zur gesteigerten Sekretion von Wasserstoffperoxid durch Alveolarmakrophagen. Zusätzlich kam es zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit Lungenfibrose- und Emphysembildung (Botas et al., 1998; Wert et al., 2000).

### **1.3.5 Phänotyp von SP-A Knock out (SP-A<sup>-/-</sup>) Mäusen**

Im Gegensatz zu SP-D<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen Mäuse, denen sowohl SP-A-mRNA wie auch das SP-A-Protein fehlt keinerlei Veränderungen in Bezug auf Vermehrung, Überlebenszeit, Zellmorphologie oder Surfactanthomöostase (Korfhagen et al., 1996) im Vergleich zu artgleichen Wildtyptieren. Demnach scheint das Fehlen von SP-A keinen relevanten Einfluss auf die Aufrechterhaltung einer normalen Lungenfunktion zu haben.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Die Surfactantproteinen A und D spielen aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften eine zentrale Rolle in der Initiierung, Chronifizierung, aber auch in der Inhibition des Asthma bronchiale. Im Rahmen dieser Arbeit soll sowohl der Einfluss von SP-A und SP-D auf die Expression der proinflammatorischen Mediatoren IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$  und deren Rezeptoren IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1, als auch der Einfluss beider Surfactantproteine auf die Expression der antiinflammatorischen Mediatoren INF $\gamma$ , IL-10 und deren Rezeptoren IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  untersucht werden.

Zu diesem Zweck werden SP-A<sup>-/-</sup>, SP-D<sup>-/-</sup> und Wildtyptiere zunächst in gleicher Anzahl auf eine Prüf- und eine Kontrollgruppe verteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe werden mit PBS sensibilisiert und provoziert, wohingegen die Tiere der Prüfgruppe mit Ovalbumin (OVA), einem starken Fremdallergen, sensibilisiert und provoziert werden. Auf diese Weise wird in den Tieren der Prüfgruppe ein Asthma bronchiale induziert.

Im Folgenden werden die Gesamtproteinkonzentrationen in BAL und Plasma mittels der BIO-Rad-Methode bestimmt, während die Konzentration von IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  durchflusszytometrisch eruiert werden. Mit Hilfe der Reverse

Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) werden die Rezeptoren der obengenannten Zytokine, IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1 und TNFR2, und die Kollektine SP-A und SP-D quantitativ bestimmt. Ebenso sollen die genannten Rezeptoren mittels einer immunhistologischen Detektionsfärbung nachgewiesen werden.

Mit Hilfe dieser Methoden sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie unterscheidet sich die Expression der Mediatoren IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-10 und deren Rezeptoren IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1, IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  zwischen Wildtyptieren der Asthmagruppe von Wildtyptieren der nicht-asthmatischen Kontrollgruppe?
- Wie unterscheidet sich die Expression der Mediatoren IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-10 und deren Rezeptoren IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1, IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  zwischen Wildtyptieren der nicht-asthmatischen Kontrollgruppe von Knock out Tieren der nicht-asthmatischen Kontrollgruppe?
- Gibt es Expressionsunterschiede von o.g. Zytokinen und deren Rezeptoren zwischen Wildtyptieren und Knock out Tieren der Asthmagruppe?
- Gibt es Expressionsunterschiede von o.g. Zytokinen und deren Rezeptoren zwischen Knock out Tieren der Asthmagruppe und Knock out Tieren der nicht-asthmatischen Kontrollgruppe?
- Welche Aussage lässt sich anhand des nachgewiesenen Expressionsmusters von o.g. Zytokinen und deren Rezeptoren über den Einfluss der Surfactantproteine A und D auf das chronisch allergische Asthma treffen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Medien, Laborgeräte und Tiere

Amersham Pharmacia Supply:	Electrophoresis power supply Gelkammer ( Horizontal Minigel System)
Acros Organics ( USA):	Tris
Baker (Holland):	Isopropanol Methanol
Becton Dickinson (USA):	CBA Mouse Soluble Protein Flex Set (IL – 4, 5, 13, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
Baxter Deutschland GmbH:	isotone Kochsalzlösung
Behring ( Marburg):	20 × PBS Konzentrat
Bio – Rad ( Hamburg):	Bio – Rad Protein Assay TEMED Tween 20
Boehringer ( Mannheim):	Ethidiumbromid
Eppendorf (Hamburg):	Mastercycler 5330
Gibco (Großbritannien):	10 × PBS
Heraeus:	Biofuge fresco

Köttermann:	Wasserbad
Menzel (Braunschweig):	SuperFrost Plus Objektträger Deckgläser
Merck ( Darmstadt):	Borsäure NaOH β- Mercaptoethanol Aquatex
Merial GmbH ( Hallbergmoos):	Narcoren
Pharmacia ( Uppsala):	dNTP – Set ( 100mM)
Riedel – de Haën ( Seelze):	Natriumcitrat – 2 - hydrat
Roche (Grenzach – Wyhlen):	Liquemin ( Na – Heparin) 25000IE
Roth ( Karlsruhe):	EDTA NaCl Agarose NEEQ Ultra Qualität Natriumcitrat
Sigma ( Taufkirchen):	Tris Bromphenolblau OVA Grad V Coomassie Brilliant Blue R – 250 Xylencyanol
Zymed Laboratories Inc. ( USA):	Blocking solution goat serum Blocking solution rabbit serum Biotinylierten 2. AK rabbit × goat IgG



Biotinylierten 2. AK to rabbit  
HRP – Streptavidin Plus  
AEC

### 2.1.2 Antikörper

Santa Cruz Biotechnology ( USA): SP – D, goat polyklonal IgG  
SP – A, goat polyklonal IgG  
TNFR1, goat polyklonal IgG  
TNFR2, goat polyklonal IgG  
IL – 13R $\alpha$ 1, goat polyklonal IgG  
IL – 4R $\alpha$ , rabbit polyklonal IgG  
IL – 10R, rabbit polyklonal IgG  
CC10, rabbit polyklonal IgG

R + D: IL – 13R $\alpha$ 2 goat anti - mouse IgG

Die verwendeten Antikörper hatten alle eine Ausgangskonzentration von 200  $\mu$ g/ml.

### 2.1.3 Enzyme

invitrogen Corporation: Taq DNA Polymerase, 10  $\times$  PCR – Puffer  
50mM Magnesiumchlorid  
SuperScript Reverse Transcriptase

### 2.1.4 PCR-Primer

SP-A 3' mouse: 5'-GCAGGCAGCCCTTATCATTC-3'  
SP-A 5' mouse: 5'-CTTCAGACTGCACTCTACGA-5'

L-32 3' mouse:	5'-TACAGCACCATAGTCTCAAC-3'
L-32 5' mouse:	5'-GTCTTGAGAAGATCATGGCT-3'
SP-D 3' mouse:	5'-TGCACACCAGGGGCACCTCT-3'
SP-D 5' mouse:	5'-GTCATGTGTAGCCCAACAGA-5'
IL-4R $\alpha$ 3' mouse:	5'-ACACGCGCCGTATAGTAGAC-3'
IL-4R $\alpha$ 5' mouse:	5'-TGGACTGCAGTTCTCAGCTC-3'
TNFR1 m3':	5'-AGACCTAGCAAGATAACCAG-3'
TNFR1 m5':	5'-ATCTGCTGCACCAAGTGCCA-3'
TNFR2 m3':	5'-ACGATGTAAGGATGCTTGGA-3'
TNFR2 m5':	5'-CGTACATGTTTGAGCTGCAC-3'
IL-13R $\alpha$ 1 m3':	5'-ATCAGATTCGGTATTCTGGC-3'
IL-13R $\alpha$ 1 m5':	5'-GCTGTGACTGAGCTCAAGTG-3'
IL-13R $\alpha$ 2 m3':	5'-AGTCTGATGAGTCCAAGTTG-3'
IL-12R $\alpha$ 2 m5':	5'-ATAGCGACAGCTGGAAGACT-3'
IL-10R m3':	5'-AGGACTGAGTCTCTCAGCTC-3'
IL-10R m5':	5'-CTGACAGTGGATAGCGTGAC-3'
IL-10R $\beta$ m3':	5'-CACAGATGGGTTCCTCCAC-3'
IL-10R $\beta$ m5':	5'-AGATCACTGCAAGCGCACTG-3'

### 2.1.5 Software

Software CellQuest 3.2.1.	Becton Dickinson
Software SigmaStat	SPSS

## 2.2 Lösungen und Medien

### Medien für die Typ II – Zellisolation

Medium I:	500 ml DMEM (high glucose + glutamin) 146 mg L – Glutamin vom Medium 12,5 ml abnehmen und durch 12,5 ml HEPES 1M ersetzen
Medium II:	Medium I + 50 ml fötales Kälberserum (sterilfiltriert) + 0,55 ml Gentamicin 10mg/ml + 0,55 ml Penicillin G 100.000 IE/ml (= 100U/ml)
Low melt – Agarose:	0,5 g low melt Agarose in 50 ml PBS kochen und im Wasserbad bei 40°C bis zur Instillation aufbewahren
Dispase:	5 mg in 1ml Aqua dest. lösen + 12 ml steriles PBS ( ohne Mg, ohne Ca)
DNase:	375 µg in 1,5 ml Medium lösen
Je AK – Platte:	6 ml PBS + 1 Tröpfchen Tween 20 84 µl anti – mouse CD45 32 µl anti – mouse CD16/CD32 das Ganze gut auf der Platte verteilen und bei 4°C mindestens 18 Stunden inkubieren

### 10 × TBE – Puffer

108,0 g/l Tris  
55,0 g/l Borsäure  
9,3 g/l EDTA  
in 1l H<sub>2</sub>O

5 × DNA – Auftragspuffer für Agarosegele

0.25% Bromphenolblau  
0.25% Xylencyanol  
30% Glycerol  
in H<sub>2</sub>O

10 × TBS

12,1 g /l Tris  
87,0 g/l NaCl  
in H<sub>2</sub>O  
pH 7,5

Tiere

C57BL/6 Mäuse

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Für alle Untersuchungen wurden sechs Wochen alte C57BL/6 Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden geschlechterspezifisch unter keimarmen Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur von 21°C und konstanter Luftfeuchtigkeit in Käfigen gehalten. Sie erhielten ovalbuminfreies Futter und Wasser ad libitum.

### **2.3.2 Induktion der chronisch-allergischen Atemwegsinflammation**

Die Sensibilisierung gegen ein Protein stellt die Grundvoraussetzung zur Initiierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensibilisierungsreaktion im Maus-Modell durch dreimalige (Tag 0, 14 und 21) intraperitoneale Applikation von 10 µg artfremden Ovalbumins (OVA), gelöst in 100 µl PBS in Verbindung mit 100 µl Aluminiumhydroxid (AL(OH)<sub>3</sub>), welches als Adjuvans dient, ausgelöst. Die systemische Applikation von Ovalbumin induziert die Bildung OVA-spezifischer TH<sub>2</sub>-Zellen, wie sie auch beim humanen Asthma bronchiale gefunden werden können. Zur Induktion einer chronischen Entzündungsreaktion erfolgte an den Tagen 26,27; 33,34; 40,41; 47,48; 54,55; 61,62; 68,69; 75,76; 82,83; 89,90; 96,97; 103 und 104 die Provokation der Tiere mit einem 5%igen OVA-Aerosol für 20 Minuten in einer dichten Expositions-kammer, wodurch ein Antigenkontakt in den Lungen der Versuchstiere ausgelöst wurde, der die lokale Entzündungsreaktion initiierte und durch die Versuchsdauer von zwölf Wochen auch strukturelle Veränderungen (airway remodelling) hervorrief, durch die das humane Asthma bronchiale charakterisiert ist. Die Analyse der Tiere erfolgte am Tag 105.

### **2.3.3 Tierpräparation**

Zunächst wurden die Tiere am Tag 105 durch Injektion von 0,2 ml eines Narcoren-Liquemin-Gemisches letal sediert. Anschließend wurde bei den getöteten Tieren die Trachea freigelegt und über eine kleine Inzision eine Trachealkanüle eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Über diese Kanüle erfolgte die bronchoalveoläre Lavage (BAL) der Lunge durch Applikation von 1 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung. Im Anschluss an die BAL erfolgte die Gewinnung von Serumproben durch Vasotomie eines Iliakalgefäßes und anschließende Zentrifugation des entnommenen Blutes bei 2000 g für 10 Minuten. Der zellfreie Überstand wurde danach abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Im Anschluss an die Gewinnung der Serumproben erfolgten die Präparation des Diaphragmas sowie die Eröffnung des Mediastinums und die Freilegung beider Lungen. Durch die sich anschließende Inzision des rechten Ventrikelmyokards erhielt man Zugang zu den Aa. pulmonales. Durch Einführen eines kleinen Spülkatheters in die Aa. pulmonales erfolgte die Perfusion der Lunge mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung, bis diese makroskopisch komplett weiß erschien. Nach ausreichender Lungenperfusion wurden 2 ml Dispase in die Lunge instilliert. Anschließend erfolgte die Instillation von 0,5 ml 1%iger low melt Agarose in die Lunge sowie die 2-minütige Abdeckung der Lunge mit Eis. Nach vollständiger Aushärtung der Agarose erfolgte die Entnahme der Lunge aus dem Tierkörper und die anschließende Aufarbeitung des Gewebes entsprechend der gewünschten Zellreihe.

### **2.3.4 Isolation von Typ-II-Pneumozyten**

Nach der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Freipräparation der Lungen wurden diese für 45 min in 2ml Dispase angedaut und bis zum folgenden Schritt auf Eis gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lungen von Trachea und Herz befreit, für 10 min in einem Gemisch aus 1,5 ml Medium I und 250  $\mu\text{g/ml}$  DNase in einem UZ-Röhrchen zerschnitten und für 5 min leicht geschüttelt. Das entstehende Zellgemisch wurde anschließend über Filter verschiedener Porengröße gegeben ( 2-fach Mull, 150  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ ), mit 7 ml Medium I nachgespült und sofort auf Eis gelagert. Nach der Filtration wurden die gewonnenen Zellen für 8 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 130g

zentrifugiert. In der bestehenden Zwischenzeit wurden die Antikörperplatten 2× mit Medium I gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Medium II/Maus aufgenommen, auf jeweils eine gewaschene Antikörperplatte gegeben und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand mit den Zellen von den Platten genommen, erneut für 8 min bei  $130 \times g$  zentrifugiert, in 5 ml Medium II aufgenommen und gezählt. Nach Quantifizierung der Typ-II-Zellen wurden diese bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

### **2.3.5 RNA-Isolation**

Für die Reverse Transcriptase – PCR (RT-PCR) wurde aus den zu untersuchenden Typ-II-Pneumozyten RNA isoliert, die später als Ausgangsmaterial der cDNA-Synthese verwendet wurde.

$5 \times 10^6$  Typ-II-Zellen wurden in 1ml Trizol lysiert und 5 min bei 15° - 30°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform/ml Trizol dazugegeben, für 15 s gevortext und nochmals 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation der Zellsuspension wurde diese für 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde in ein frisches Tube überführt, die organische Phase wurde für die Protein- bzw. DNA – Isolation bei -20°C aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde mit 500 µl Isopropanol/ml Trizol vermischt, für 10 min bei 15° - 30°C inkubiert und anschließend 15 min bei 2° - 8°C mit über  $12000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Suspensat mit 1 ml 75%igem Ethanol pro ml Trizol gewaschen und erneut 5 min bei 2° - 8°C und  $7500 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und die RNA luftgetrocknet. Das vollständig trockene RNA-Pellet wurde in 30 µl frisches, destilliertes Wasser aufgenommen, gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend 10 min bei 55°C inkubiert. Wurde die RNA nicht direkt zur cDNA-Synthese verwendet, erfolgte die Aufbewahrung bis zur weiteren Analyse bei -80°C.

### 2.3.6 Proteinisolation

Zur Proteingewinnung wurden zunächst ebenfalls  $5 \times 10^6$  Typ-II-Zellen in 1ml Trizol lysiert und 5 min bei  $15^\circ - 30^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform/ml Trizol dazugegeben, für 15 s gevortext und nochmals 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation der Zellsuspension wurde diese für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der wässrige Überstand wie im vorherigen Abschnitt zur RNA-Isolation verwendet. Der organische Überstand wurde pro Tube mit 750  $\mu\text{l}$  Isopropanol gemischt und 10 min bei  $15^\circ - 30^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde das Gemisch 10 min bei  $12000 \times g$  und  $2^\circ - 8^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet  $3 \times$  mit 2 ml/ml Trizol 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95%igem Ethanol gewaschen. Wurde das Protein nicht direkt weiter verarbeitet, wurde es im 3. Waschzyklus bei  $-30^\circ\text{C}$  eingefroren werden.

### 2.3.7 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden 2  $\mu\text{g}$  Gesamt – RNA eingesetzt. Um einen 20 $\mu\text{l}$  Ansatz herzustellen wurde die RNA mit destillierten Wasser auf 10, 5  $\mu\text{l}$  verdünnt, mit 0,5  $\mu\text{l}$  Oligo dT gemischt, 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert und auf Eis gestellt.

Äquivalent zur Probenanzahl wurde folgender Mix hergestellt (pro 20  $\mu\text{l}$  Ansatz):

- 4  $\mu\text{l}$   $5 \times$  Reverse Transcriptase Puffer
- 2  $\mu\text{l}$  DTT 0,1 M
- 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix 10 mM
- 1  $\mu\text{l}$  RNAGuard (= Rnase-Inhibitor)
- 1  $\mu\text{l}$  Superscript Reverse Transcriptase

Zur cDNA-Synthese wurden zu dem 11  $\mu\text{l}$  RNA-Oligo dT-Gemisch 9  $\mu\text{l}$  des Mixes hinzugegeben. Die Proben wurden 2 h bei  $41^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert, 10 min bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert, mit je 40  $\mu\text{l}$  frischem destillierten Wasser verdünnt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.



### 2.3.8 cDNA-Amplifikation mittels Reverser Transkription

Für die RT – PCR wurde je Probe ein 100 µl Ansatz bestehend aus 1 µl cDNA und 99 µl des folgenden Mixes hergestellt:

10 µl 10 × PCR – Puffer

1 µl dNTP 20 mM

3 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM

82,5 – MgCl<sub>2</sub> µl H<sub>2</sub>O

2,5 µl 5' – Primer 20 pmol/µl

2,5 µl 3' – Primer 20 pmol/µl

0,5 µl Taq 5U/µl

Um die Proben in der vom jeweiligen Primer abhängigen Phase im Thermocycler vor Kondensation zu schützen, wurden je Tube vor Beginn der Amplifikation 2 Tropfen Mineralöl aufgetragen. Die zur Amplifikation insgesamt verwendete Zykluszahl und notwendige Annealingtemperatur richteten sich nach den verwendeten Primern und kann Tabelle 1 entnommen werden. Gleich waren bei allen verwendeten Primern die Denaturierungstemperatur, welche bei 94°C lag und die verwendete Extensionstemperatur, welche bei 72°C lag.

Primer	Annealing-Temperatur (°C)	Zykluszahl
IL4R	60	30
IL-10R	62	30
IL-10Rβ	62	30
IL-13Rα1	60	35
IL-13Rα2	56	35
L-32	58	30
SP-A	60	25
SP-D	58	30
TNFR1	60	30

**Tabelle 1:** Zur reversen Transkription verwendete Primer, primerabhängige Zykluszahl sowie gewählte Annealingtemperaturen

### **2.3.9 Agarosegelelektrophorese**

Aufgrund der Länge der zu untersuchenden DNA – Fragmente wurden 1,8%ige Agarosegele in  $1 \times$  TBE hergestellt, welcher ebenfalls als Laufpuffer für die Elektrophorese diente.

Die mit Auftragspuffer versetzten Proben wurden bei einer Spannung von 120 – 121 V der Gelelektrophorese unterzogen.

Nach ausreichender Auftrennung wurden die Gele in ethidiumbromidhaltigem Laufpuffer 20 min gefärbt. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet und photographisch festgehalten.

### **2.3.10 Immunhistologie**

Immunhistologische Untersuchungen wurden nur an Lungen vorgenommen, an denen im Rahmen der Tier-Präparation keine BAL durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Lungen nach erfolgter Präparation direkt in Formaldehyd fixiert und anschließend durch die Kollegen des pathologischen Instituts der Philipps-Universität Marburg in Paraffinblöcke eingebettet. Aus den in Paraffin eingebetteten Proben wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 2  $\mu$ m gewonnen. Diese wurden zunächst für 2 h bei 55°C überschmolzen und anschließend in mehreren Schritten entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden die Schnitte zunächst 4 $\times$  5 min in Xylol und anschließend für 2 $\times$  3 min in 100%igen Alkohol getaucht. Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation in einem 3%igen Wasserstoffperoxid – Methanol – Gemisch, um die gewebeeigene Peroxidaseaktivität zu neutralisieren. Anschließend wurden die Schnitte einmal für 5 min bei 600 Watt und danach 2 $\times$  für 3 min in 0,01 M Citratpuffer aufgekocht. Der dabei entstehende Flüssigkeitsverlust wurde durch Auffüllen von destilliertem Wasser kompensiert. Nach vollständigem Erkalten der Präparate wurden diese mit 4°C kaltem TBS gespült. Das entparaffinierte und rehydrierte Gewebe wurde anschließend 3 $\times$  2 min mit  $1 \times$  PBS gewaschen und für 10 min mit einem entsprechenden Blocking-Reagenz inkubiert. Nach dem Dekantieren des Blocking-Reagenz wurden die Gewebeschnitte über Nacht mit den entsprechenden Primärantikörpern, deren Konzentration Tabelle 2 zu entnehmen ist, inkubiert und im Anschluss daran erneut 3 $\times$  2 min mit  $1 \times$  PBS gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Inkubation mit einem kompatiblen,

biotinylierten Sekundärantikörper und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und erneutes 3 maliges Waschen mit  $1 \times$  PBS. Die gewaschenen Gewebeschnitte wurden anschließend für 10 min mit dem Substrat der Peroxidase (AEC Chromogen) inkubiert, mit destilliertem Wasser gespült, 15 s mit Hämalaun gegengefärbt und abschließend 1 bis 2 min unter fließendem Wasser gespült. Die noch nassen Präparate wurden sofort mit Aquatex eingedeckt.

Antikörper	Konzentration
Anti-mouse IL-4R $\alpha$	1:50
Anti-mouse IL-10R	1:50
Anti-mouse IL-13R $\alpha$ 1	1:1000
Anti-mouse IL-13R $\alpha$ 2	7,5 $\mu$ g/ $\mu$ l
Anti-mouse SP-A	1:1000
Anti-mouse SP-D	1:1000
Anti-mouse TNFR1	1:250

**Tabelle 2:** Zur Immunhistologie eingesetzte Primärantikörper sowie deren eingesetzte Konzentrationen

### 2.3.11 Bestimmung von Zytokinen mittels CBA-Flex-Cytometer

Die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  in BAL und Serum wurde mit der CBA-Methode bestimmt. Als Zytokinstandards wurden neun Verdünnungen in Bereich von 20-5000 pg/ml benutzt.

Die CBA-Analyse stellt einen Partikel-Immuno-Assay dar, bei dem fünf verschiedene Arten von Latex-Partikeln bei Anregung durch einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm ein unterschiedliches Fluoreszenzmuster aufweisen. Jedes Latexpartikelchen ist mit einem für das nachzuweisende Zytokin spezifischen Antikörper, dem sogenannten Capture-Bead gekoppelt. Der verwendete Kit beinhaltete Partikel, die mit einem spezifischen Antikörper gegen die Zytokine 4, 5, 13, TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  gekoppelt waren. Nach Zugabe der BAL-/Serumproben bzw. der Zytokinstandards wurde ein zweiter PE-konjugierter Antikörper (PPPE Detection Reagenz) hinzugegeben und das ganze schließlich mittels FACS-Scan und Becton Dickinson CBA Software ausgewertet. Durch die Anregung mit dem Laser wurden bei jedem Latexpartikel, der ein Zytokin gebunden hatte, zwei Fluoreszenzsignale hervorgerufen, wodurch sich einerseits

aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel die Zytokine diskriminieren ließen und andererseits anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper Rückschlüsse auf die Konzentrationen der unterschiedlichen Zytokine geschlossen werden konnten. Die Analyse erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls.

### **2.3.12      Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SigmaStat verwendet. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standard Error of the Mean angegeben. Signifikanzen wurden dabei bei normalverteilten Daten mittels t-Test und bei nicht-normal verteilten Daten mittels Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der Surfactantproteine SP-A und SP-D auf verschiedene biochemische und strukturelle Parameter des chronisch allergischen Asthmas untersucht werden. Mit Hilfe von SP-D knock out respektive SP-A knock out Tieren sollte ein im Vergleich zu Wildtyptieren verändertes Zytokin- bzw. Zytokinrezeptorexpressionsmuster gezeigt werden.

Für die Versuche wurden C57BL/6 –Wildtypiere, sowie C57BL/6-SP-A und SP-D knock out Tiere entsprechend eines Protokolls zur Induktion eines chronisch allergischen Asthmas behandelt und die aus ihnen gewonnen Materialien dem weiteren Verwendungszweck entsprechend aufgearbeitet. Anschließend erfolgten die Bestimmungen der Gesamtproteinkonzentration in Plasma, BAL und Zelllysat mittels der BIO-Rad Methode, eine durchflusszytometrische Untersuchung der Interleukine 4, 5, 10, 13 und TNF $\alpha$  mittels des CBA Flex-Systems und eine immunhistochemische Detektionsfärbung der oben genannten Zytokinrezeptoren und der Kollektine SP-A und SP-D.

Des Weiteren erfolgte die Messung der mRNA-Expression der Zytokinrezeptoren und der beiden Surfactantproteine A und D.

Vor der Durchführung der receptorspezifischen RT-PCR erfolgte die Quantifizierung der cDNA-Menge, die für die spätere RT-PCR eingesetzt werden sollte, mittels des Housekeeping-Gens L-32. Hierfür wurden je cDNA zunächst 1 $\mu$ l eingesetzt und die Volumina letztlich so lange verändert bis densitometrisch Banden gleicher Intensität beobachtet werden konnten.

Die folgende Abbildung zeigt die cDNA-Quantifizierung anhand einer L-32 PCR mit der cDNA von Kontrolltieren.

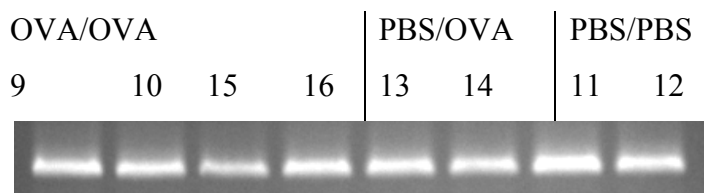
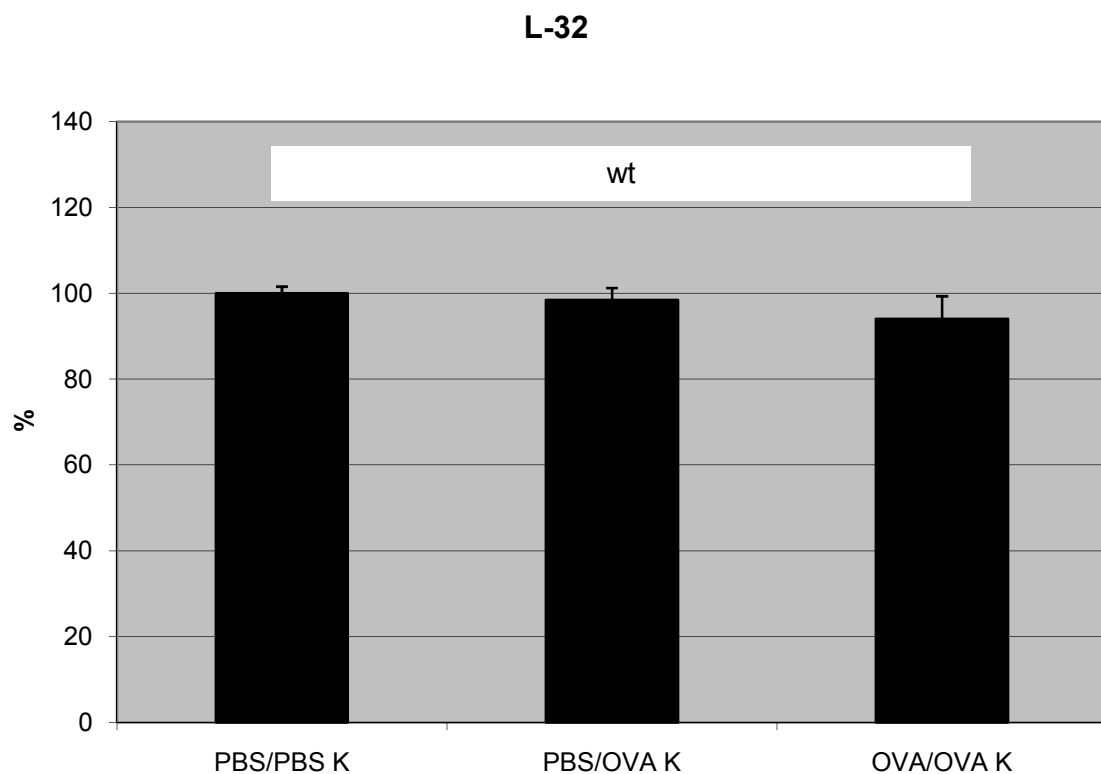


Abbildung 6: Densitometrische Banden des Housekeeping-Gens L-32 der wt-Tiere

Nach der densitometrischen Intensitätsbestimmung erfolgte die statistische Auswertung der ermittelten Flächen mittels des Programms SigmaStat. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden dabei bei normalverteilten Daten mittels t-Test ermittelt. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die graphische Darstellung der analog des beschriebenen Verfahrens ermittelten Daten.



**Abbildung 7: Densitometrisch bestimmte mRNA-Expressionswerte des Proteins L-32**

**Tabelle 3: Statistisch ermittelte Flächenwerte des Proteins L-32**

	PBS/PBS	PBS/OVA	OVA/OVA
Mittelwert Volumen	19916,1	19592,5	18719,5
Standardabweichung	866	1579,5	421859
SEM	612,35	1116,87	2109,29
Statistische Signifikanz		nein	Nein

Die ermittelten Flächenwerte der wt PBS/PBS Tiere wurden in jeder durchgeführten RT-PCR gleich 100% gesetzt und als Flächenwert  $\pm$  SEM (%) graphisch aufgetragen. Die Flächenwerte der anderen Behandlungsgruppen wurden anhand der wt PBS/PBS – Referenzwerte entsprechend umgerechnet und ebenfalls als Flächenmittelwert (%)  $\pm$  SEM (%) graphisch veranschaulicht.

### **3.1 Proteinmengen in bronchoalveolärer Lavage und Plasma**

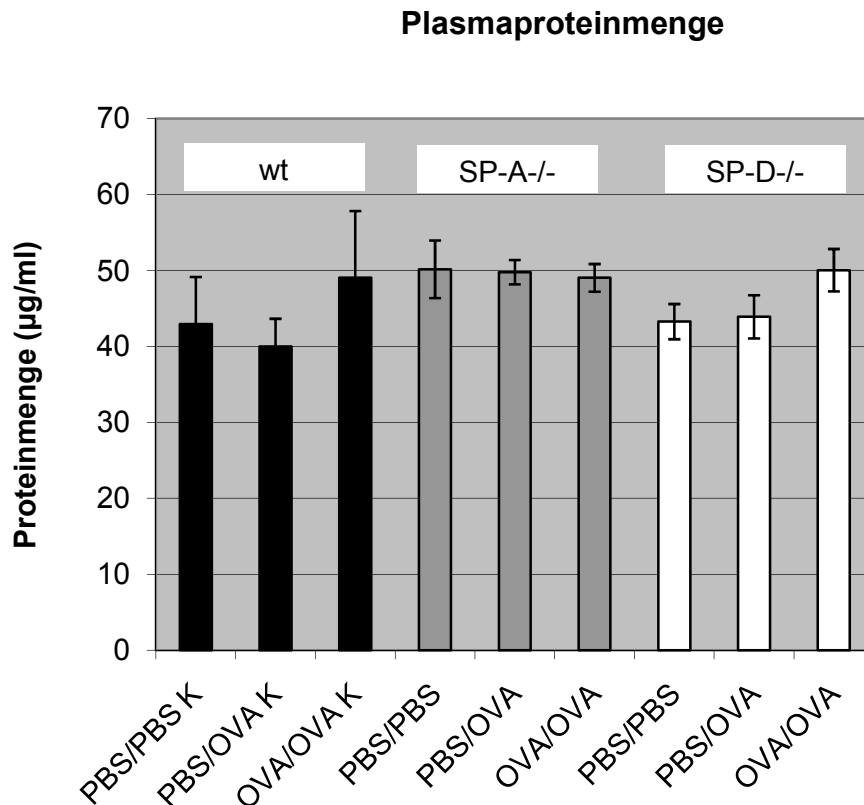
Um mögliche Einflüsse von SP-A und SP-D auf die Proteinmenge zu untersuchen, wurden die Proteinspiegel von Wildtyptieren und SP-A resp. SP-D -/- Tieren sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavage bestimmt.

Im Plasma lagen die Proteinmengen der Wildtyptiere zwischen 40  $\mu\text{g/ml}$  (wt PBS/OVA) und  $49,07 \pm 17,51 \mu\text{g/ml}$  (wt OVA/OVA).

Ein vergleichbarer Proteingehalt zeigte sich auch im Plasma der SP-D-/- Tiere: hier konnten Proteinmengen von  $43,27 \pm 4,64 \mu\text{g/ml}$  bei PBS/PBS – Tieren,  $43,9 \pm 5,71 \mu\text{g/ml}$  bei PBS/OVA – Tieren und  $50,04 \pm 5,6 \mu\text{g/ml}$  ermittelt werden.

Die Plasmaproteinmengen der SP-A-/- lagen in ähnlichen Bereichen und zeigten lediglich nicht signifikante Schwankungen: so lag die Proteinmenge der PBS/PBS – Tiere bei  $50,15 \pm 7,38 \mu\text{g/ml}$ , die der PBS/OVA – Tiere bei  $49,78 \pm 3,18 \mu\text{g/ml}$  und die der OVA/OVA – Tiere bei  $49,03 \pm 3,65 \mu\text{g/ml}$ .

Eine graphische Veranschaulichung dieses Sachverhaltes zeigt sich in Abbildung 8.



**Abbildung 8:** Gesamtplasmaproteinspiegel bei Wildtyptieren, SP-A-/- Tiere und SP-D-/- Tiere

Bei der Untersuchung der Proteinmengen in der bronchoalveolärer Lavage zeigte sich in der Gruppe der Wildtyptiere eine Proteinzunahme bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren im Vergleich zu den PBS/PBS bzw. PBS/OVA behandelten Tiere. So fanden sich bei den wt PBS/PBS – Tieren Proteinmengen von  $277,95 \mu\text{g/ml} \pm 31,94 \mu\text{g/ml}$ , bei den wt PBS/OVA – Tieren  $238,84 \mu\text{g/ml} \pm 24,09 \mu\text{g/ml}$  und bei den wt OVA/OVA – Tieren  $387,7 \mu\text{g/ml} \pm 39,84 \mu\text{g/ml}$ .

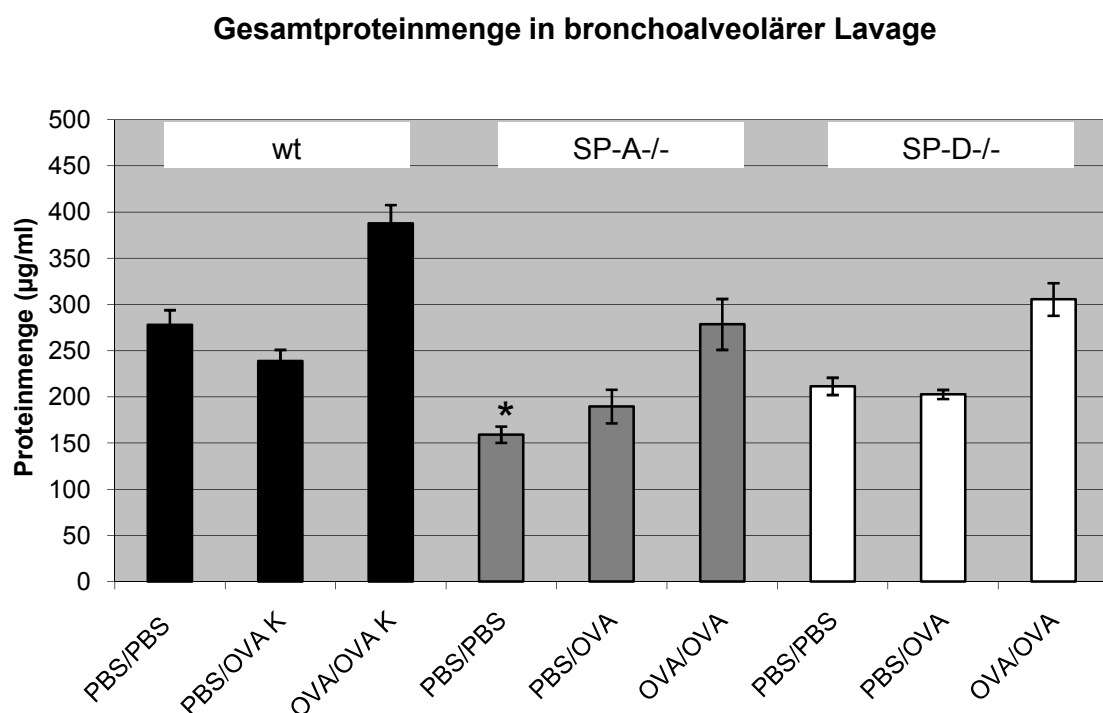
Betrachtet man nun die Proteinspiegel bei den SP-A-/- Tieren zeigte sich einerseits, dass die Gesamtproteinmengen von den mit PBS/PBS behandelten Tieren zu den mit OVA/OVA behandelten Tieren kontinuierlich ansteigen, andererseits aber je nach Behandlungsgruppe um ca.  $100 \mu\text{g/ml}$  unter denen der Wildtyptiere liegen. So lagen die Proteinmengen bei den SP-A-/- für die PBS/PBS-Tiere bei  $159,1 \mu\text{g/ml} \pm 17,67 \mu\text{g/ml}$ , für die PBS/OVA-Tiere bei  $189,62 \mu\text{g/ml} \pm 36,16 \mu\text{g/ml}$  und für die OVA/OVA-Tiere bei  $278,52 \mu\text{g/ml} \pm 55,13 \mu\text{g/ml}$ .

Die Differenz, die sich aus dem Vergleich von wt PBS/PBS – Tieren und PBS/PBS – Tieren der SP-A-/- ergab, ist mit einem p- Wert von 0,015 als signifikant zu betrachten.



Bei der Betrachtung der SP-D-/- Tiere zeigte sich ebenfalls ein Proteinanstieg bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren im Vergleich zu den mit PBS/PBS bzw. PBS/OVA behandelten Tieren. Aber ähnlich den SP-A-/- Tieren war die Proteinmenge der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich mit denen der Wildtypiere vermindert. Für die Proteinmengen der SP-D -/- Tiere ergaben sich folgende Werte: 211,47 µg/ml ± 18,64 µg/ml für die PBS/PBS – Tiere, 202,72 µg/ml ± 9,94 µg/ml für die PBS/OVA – Tiere und 305,58 µg/ml ± 35,31 µg/ml für die OVA/OVA-Tiere.

Abbildung 9 dient der graphischen Veranschaulichung.



**Abbildung 9: Gesamtproteinmenge in BAL von Wildtypieren, SP-A-/- Tiere und SP-D-/- Tiere**

Es zeigt sich in allen drei Gruppen eine vermehrte Proteinmenge in der BAL der mit OVA/OVA behandelten Tiere. Ferner zeigt sich beim Vergleich der wt-Tiere mit den SP-A-/- und den SP-D-/- Tieren eine verminderte Proteinmenge in der BAL. Der Vergleich zwischen PBS/PBS-Tieren der SP-A-/- und wt-Tiergruppe zeigt eine signifikant verminderte Proteinkonzentration bei den SP-A-/- Tieren (\*).

### **3.2 Bestimmung von IL-5 mit dem CBA-Flex-Cytometer**

Um zu prüfen ja welchen Einfluss die beiden Surfactantproteine A und D auf den Interleukin 5-Spiegel haben, wurden die intraoperativ gewonnenen Plasma- und Lavageproben einer Flexanalyse unterzogen.

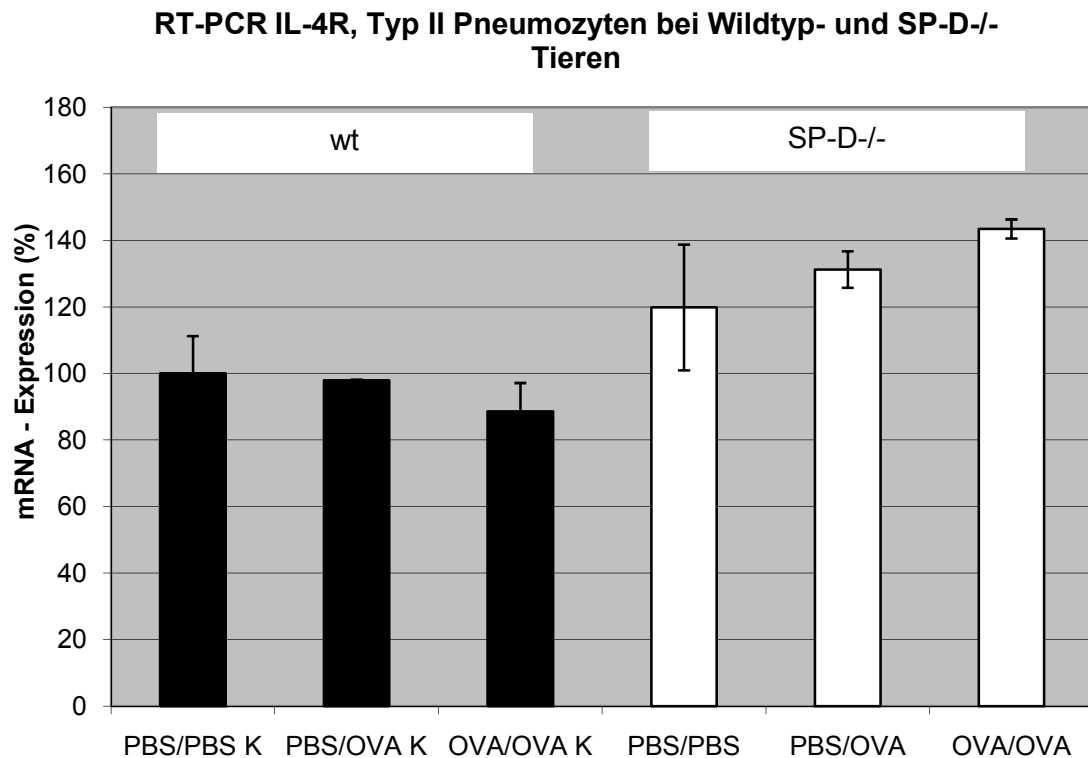
Dabei konnten aufgrund des limitierten Ausgangsmaterials weder bei den Wildtyptieren noch bei den SP-A  $-/-$  bzw. SP-D  $-/-$  Tieren messbare Zytokinkonzentrationen ermittelt werden.

### **3.3 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-4 und IL-4R $\alpha$**

#### **3.3.1 mRNA und Proteinexpression von IL-4R $\alpha$**

Die Expression dieses Rezeptors wurde für beide Gruppen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Vergleicht man die mRNA-Expression innerhalb der wt-Tiere, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den wt-Kontrolltieren (PBS/PBS:  $100\% \pm 22,4\%$  und PBS/OVA:  $97,89\% \pm 0,42\%$ ) und den wt - Asthmatisieren ( $88,62\% \pm 17,05\%$ ).

Betrachtet man nun zusätzlich die SP-D  $-/-$  Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren, zeigte sich ein kontinuierlich ansteigendes mRNA-Expressionsmuster: PBS/PBS  $119,85\% \pm 37,7\%$ ; PBS/OVA  $131,26\% \pm 10,97\%$  und OVA/OVA  $143,45\% \pm 5,7\%$  (Abbildung 10)



**Abbildung 10: IL-4-mRNA-Expression der Wildtyptiere im Vergleich zu den SP-D -/- Tieren**

Bei den wt-Tieren zeigt sich in allen drei Behandlungsgruppen eine homogene IL-4R-Expression. Bei den SP-D-/- Tieren findet man eine erhöhte IL-4mRNA-Expression bei den mit OVA behandelten Tieren.

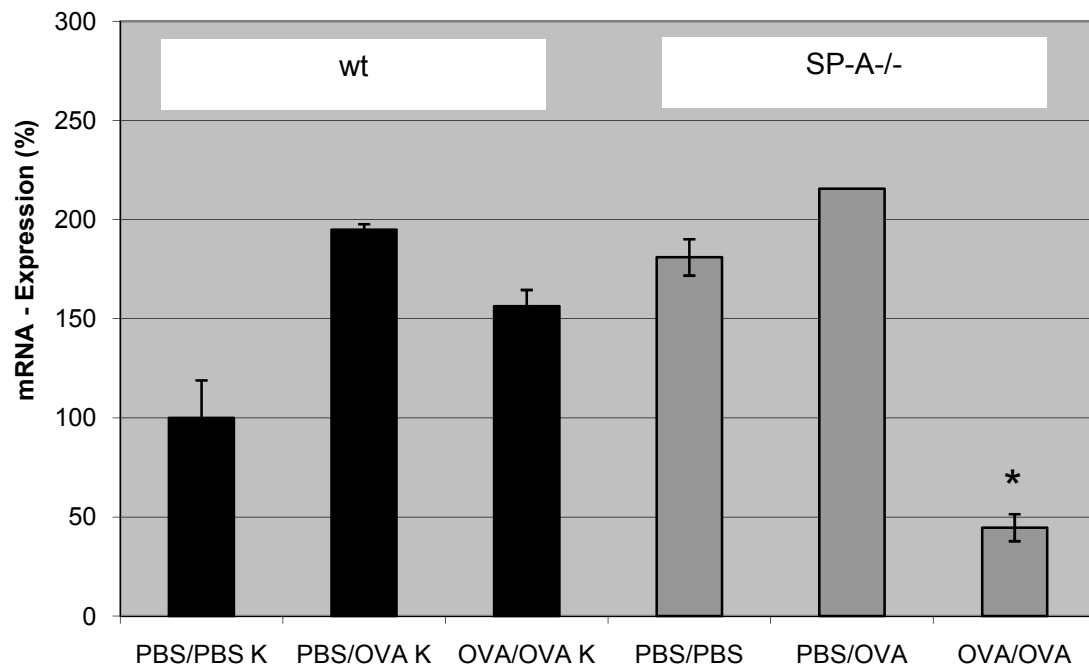
Bei SP-A -/- Tieren zeigte sich im Vergleich zu den SP-D -/- Tieren ein umgekehrtes Bild: sowohl auf molekulargenetischer als auch auf zellulärer Ebene ist die Ausprägung des Rezeptors deutlich vermindert.

Vergleicht man zunächst einmal die wt PBS/PBS-Tiere ( $100\% \pm 37,8\%$ ) mit den wt-PBS/OVA ( $194,89\% \pm 5,57\%$ )- und den wt-OVA/OVA-Tieren ( $156,33\% \pm 16,37\%$ ) fällt auf, dass die mRNA-Expression in den mit OVA behandelten Tiergruppen erhöht ist.

Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression der mit OVA/OVA behandelten SP-A-/- Tiere signifikant ( $p = 0,009$  ggü. SP-A-/- PBS/PBS Tieren,  $p = 0,004$  ggü. wt PBS/OVA bzw. wt OVA/OVA Tieren; \*) vermindert ( $44,63\% \pm 13,68\%$ ). Die mRNA-Expression der mit PBS/PBS bzw. PBS/OVA behandelten Tiere der SP-A -/- Gruppe entsprach mit  $180,95\% \pm 18,37\%$  (PBS/PBS) und  $215,53\% \pm 0\%$  (PBS/OVA) dem Expressionsmuster der wt-Tiere.

Abbildung 11 gibt die mittels RT-PCR ermittelten Werte graphisch wieder.

### RT-PCR IL-4R, Typ II Pneumozyten bei Wildtyp- und SP-A<sup>-/-</sup> Tieren

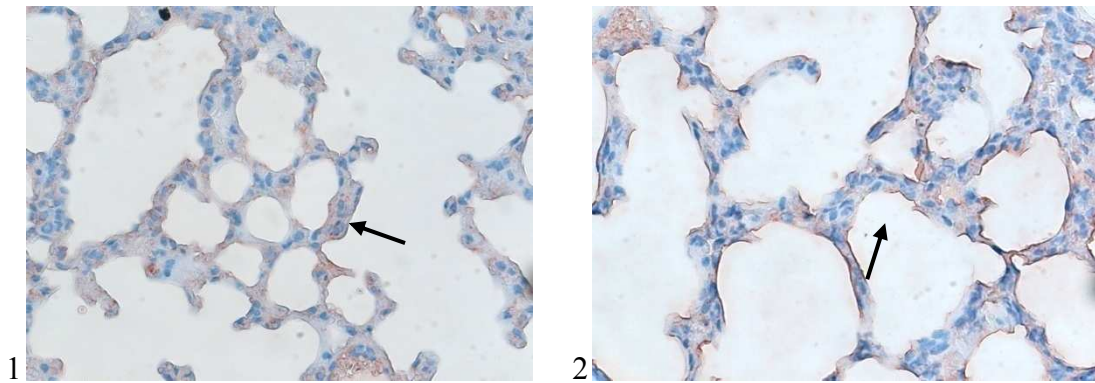


**Abbildung 11: IL-4R-mRNA-Expression der Kontrolltiere im Vergleich zu den SP-A<sup>-/-</sup> Tieren**

Bei den SP-A<sup>-/-</sup> Tieren zeigt sich in der bei den PBS/PBS-Tieren und bei den PBS/OVA-Tieren eine im Vergleich zu den wt-Tieren erhöhte IL-4R-mRNA-Expression. Sensibilisierung und Provokation mit OVA führten bei den SP-A<sup>-/-</sup> Tieren zu einer signifikant verminderten IL-4R-mRNA-Expression (\*).

### 3.3.2 Immunhistochemische Detektion von IL-4R $\alpha$

Die immunhistologische Untersuchung zeigte sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den SP-D<sup>-/-</sup> Tieren einen geringen, aber in allen 3 Behandlungsgruppen homogenen Rezeptornachweis (Abbildung 12).

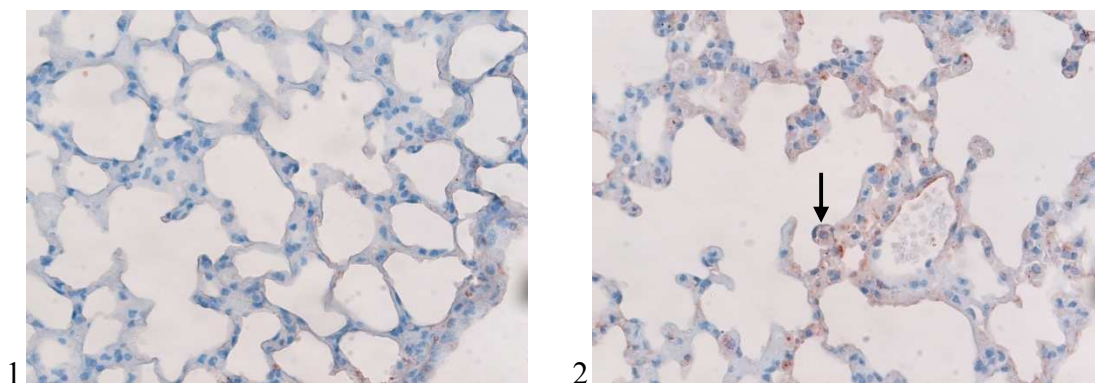


**Abbildung 12: Immunhistochemische Detektions für IL-4R $\alpha$**

**1 SP-D-/- OVA/OVA**

**2 SP-D-/- PBS/PBS**

Bei den SP-A-/- Tieren ließ sich der Rezeptor nur sehr schwach bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren nachweisen. Bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren war der Rezeptor auf der Zelloberfläche nicht anfärbbar (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Immunhistochemische Detektion von IL-4R $\alpha$  an Präparaten von SP-A-/- Tieren**

**1 SP-A-/- OVA/OVA**

**2 SP-A-/- PBS/PBS**

Mit OVA/OVA behandelte SP-A-/- Tiere zeigten keinen immunhistochemischen IL-4R $\alpha$ -Nachweis auf Zellebene. Bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren ließ sich der Rezeptor schwach nachweisen (→).

### **3.4 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-13, IL-13R $\alpha$ 1 und IL-13R $\alpha$ 2**

IL-13 und die beiden Rezeptoren IL-13R $\alpha$ 1 und IL-13R $\alpha$ 2 beeinflussen viele der beim chronischen Asthma beobachteten Umbauprozesse des Lungengewebes. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Surfactantproteine A und D auf die Regulation dieser 3 Proteine untersucht. Mittels RT-PCR und immunhistochemischer

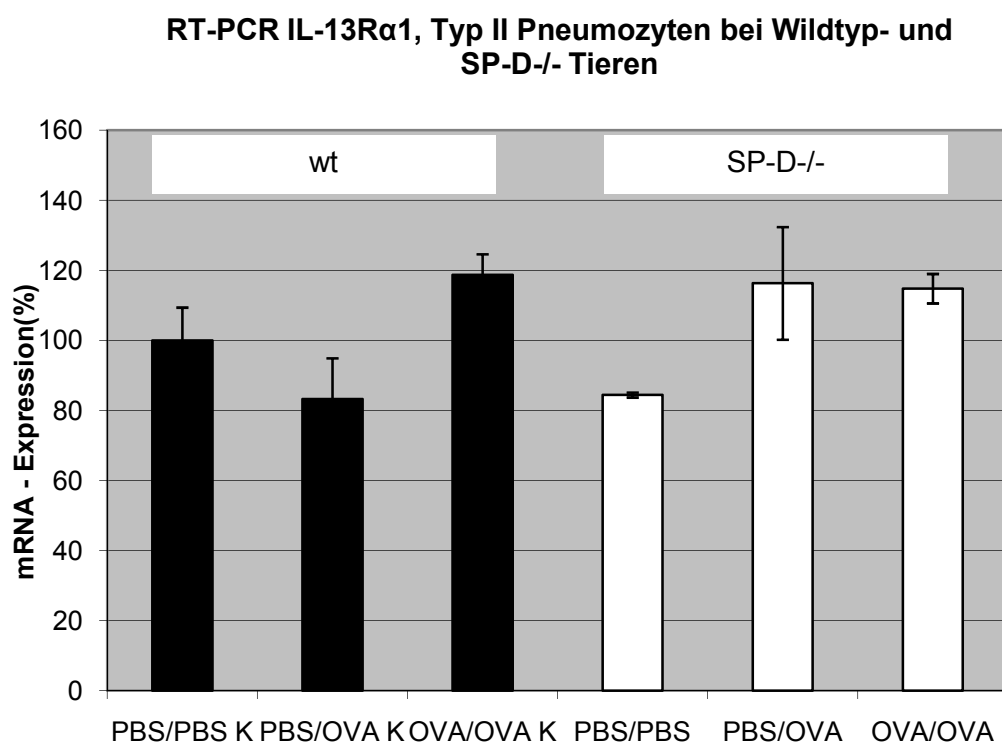
Detektionsfärbungen sollten Expressionsunterschiede der Rezeptoren auf molekularbiologischer und Proteinebene bei Wildtyptieren sowie bei SP-D<sup>-/-</sup> und SP-A<sup>-/-</sup> Tieren nachgewiesen werden.

### 3.4.1 mRNA-Expression von IL-13R $\alpha$ 1

Bei der Untersuchung der IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression war der mRNA-Spiegel der wt PBS/OVA Tiere ( $83,2\% \pm 23,5\%$ ) gegenüber dem der wt PBS/PBS Tiere ( $100\% \pm 18,8\%$ ) bzw. der wt OVA/OVA Tiere ( $118,69\% \pm 11,8\%$ ) unverändert.

Betrachtet man die SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe ist ein Anstieg der Expression bei den mit PBS/OVA bzw. OVA/OVA behandelten Tieren deutlich. Sie erreichten mit Werten von  $116,3\% \pm 32,2\%$  (PBS/OVA) bzw.  $114,8\% \pm 8,4\%$  (OVA/OVA) das gleiche IL-13R $\alpha$ 1-Expressionsniveau wie die wt OVA/OVA-Mäuse ( $118,68\% \pm 11,8\%$ ).

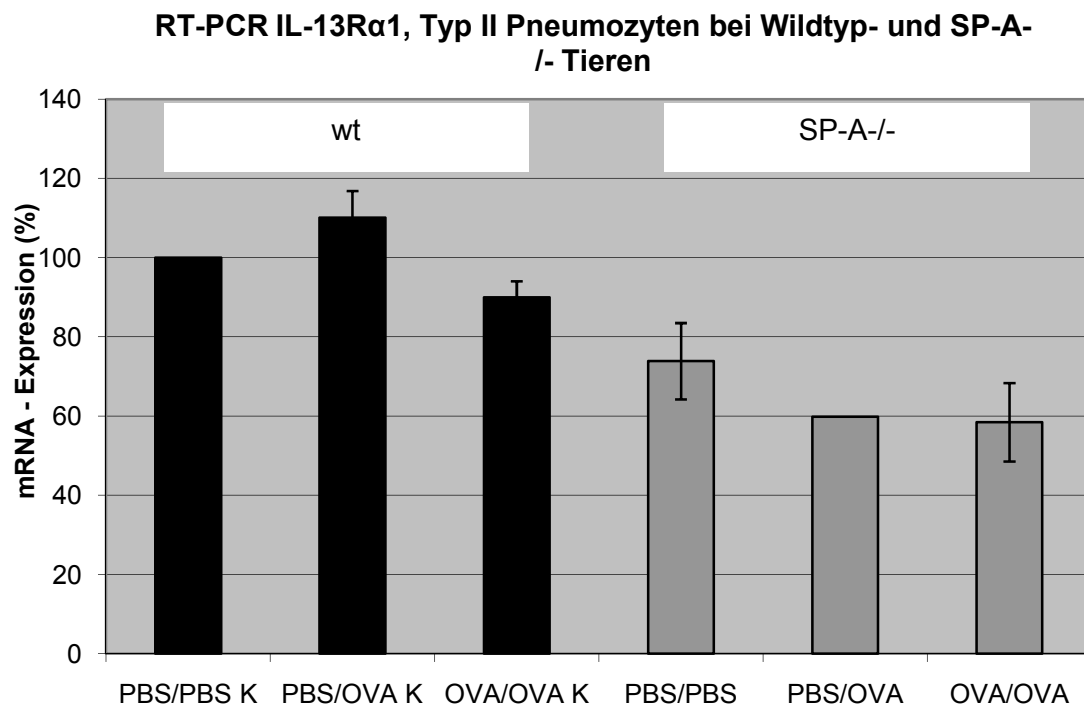
Abbildung 14 verdeutlicht die ermittelten Ergebnisse graphisch.



**Abbildung 14: IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression in wt- und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren**

Sensibilisierung mit OVA führt in der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe zu einer verstärkten IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression, während es bei den wt-Tieren zu einer leichten Reduktion der mRNA-Expression kommt. Bei den Asthmatischen zeigt sich in beiden Tiergruppen ein äquivalentes Expressionsmuster.

Die Untersuchung der IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression in der Gruppe der SP-A-/- Tiere ergab in allen 3 Behandlungsgruppen einen reduzierten mRNA-Gehalt verglichen mit der Gruppe der Wildtypiere (Abbildung 15). Weiterhin fällt in der SP-A-/- Gruppe ein von den PBS/PBS Mäusen (73,88%  $\pm$  19,3%) zu den OVA/OVA-Mäusen (58,47%  $\pm$  19,8%) abfallendes IL-13-mRNA-Niveau auf.



**Abbildung 15: IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression in wt- und SP-A-/- Tieren**

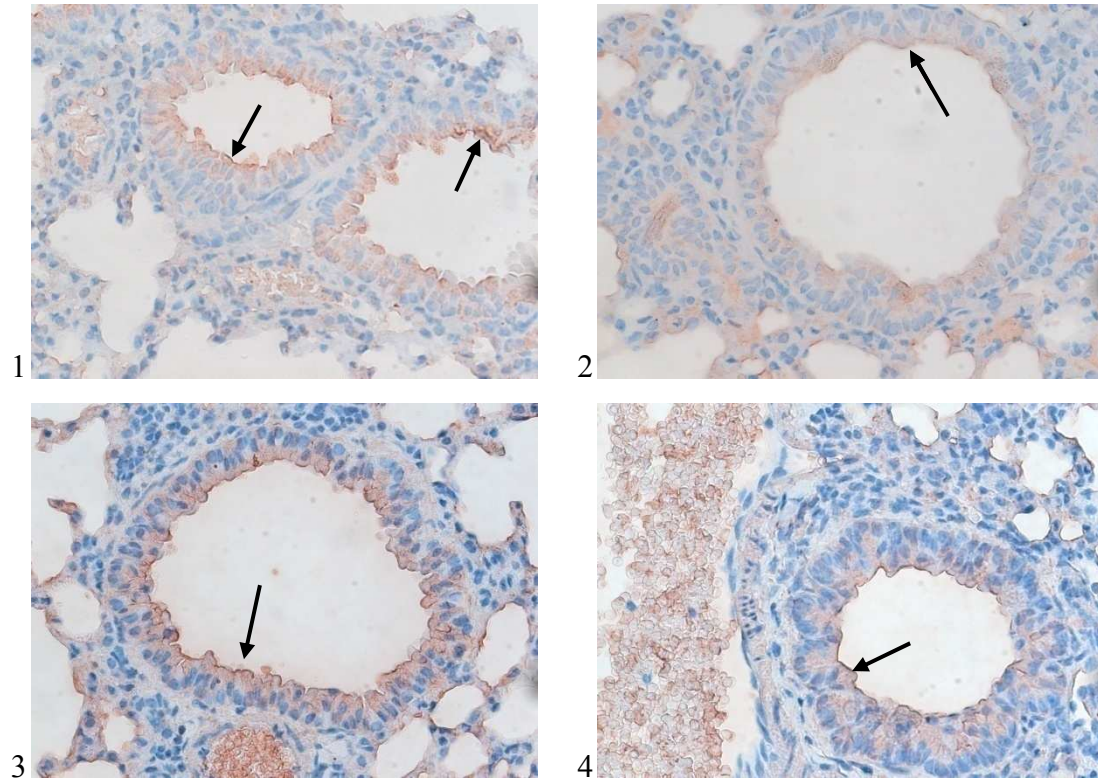
Bei den wt-Tieren zeigt sich innerhalb aller drei Behandlungsgruppen eine äquivalente Expression von IL-13R $\alpha$ 1. Die Behandlung mit OVA führt bei den SP-A-/- Tieren zu einer verminderten IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression.

### 3.4.2 Immunhistochemische Detektion von IL-13R $\alpha$ 1

Immunhistologisch konnte der Rezeptor sowohl auf der Zelloberfläche der Kontrolltiere als auch auf der der SP-D-/- Tiere in vergleichbarer Reaktionsstärke nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich v.a. im Bereich der luftleitenden Abschnitte eine stärkere Detektion bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren im Vergleich zu den mit PBS/PBS behandelten Tieren. Abbildung 16 zeigt die immunhistologische Detektions an Präparaten von SP-D-/- Tieren.

Die immunhistologische Aufarbeitung des Lungengewebes der SP-A-/- Tiere spiegelt die Ergebnisse der RT-PCR wider. So zeigt sich bei den Knock out Tieren eine

deutliche Anfärbbarkeit der von PBS/PBS Tieren stammenden Schnitte. Die Schnitte der OVA/OVA Tiere wiesen eine schwächere positive Antikörper-Rezeptor-Reaktion auf.



**Abbildung 16: Immunhistochemische Detektion für IL-13R $\alpha$ 1 in luftleitenden Abschnitten**

**1 SP-D-/- OVA/OVA**

**2 SP-D-/- PBS/PBS**

**3 SP-A-/- PBS/PBS**

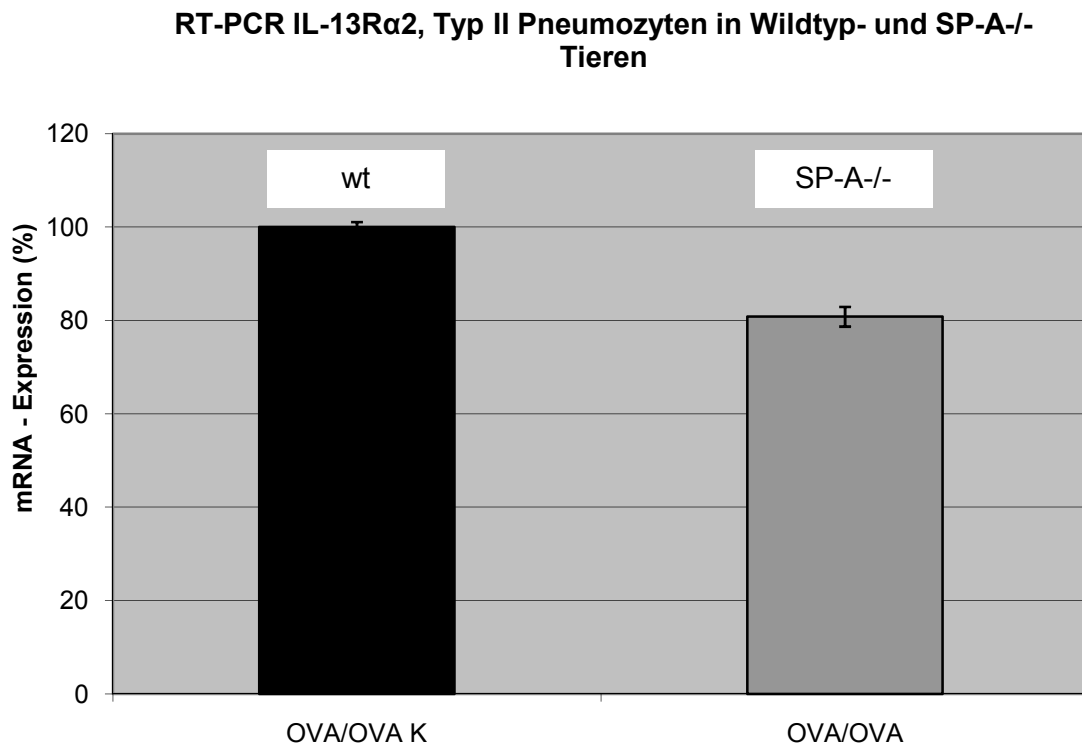
**4 SP-A-/- OVA/OVA**

### **3.4.3 mRNA-Expression von IL-13R $\alpha$ 2**

Im Fall des IL-13R $\alpha$ 2 konnte die entsprechende mRNA innerhalb der Wildtypgruppe lediglich bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren nachgewiesen werden. Analog zu dem bisher angewendeten Auswertungsverfahren wurde die bei den wt OVA/OVA Tieren gemessene mRNA-Expression gleich 100%  $\pm$  Standardabweichung gesetzt und die innerhalb der knock out Gruppen erhaltenen Werte zu diesen in Beziehung gebracht. In der Gruppe der SP-D-/- ließ sich weder bei den mit PBS/PBS behandelten noch bei den mit PBS/OVA bzw. OVA/OVA behandelten Tieren IL-13R $\alpha$ 2-mRNA nachweisen.



Die SP-A<sup>-/-</sup> Tiere wiesen ähnlich wie die Wildtyp-tiere nur bei den OVA/OVA behandelten Tieren messbare mRNA – Konzentrationen auf. Diese waren - wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird- im Vergleich zum Spiegel der wt OVA/OVA Tiere ( $100\% \pm 2,25\%$ ) vermindert (SP-A<sup>-/-</sup> OVA/OVA  $80,82\% \pm 4,21\%$ ).

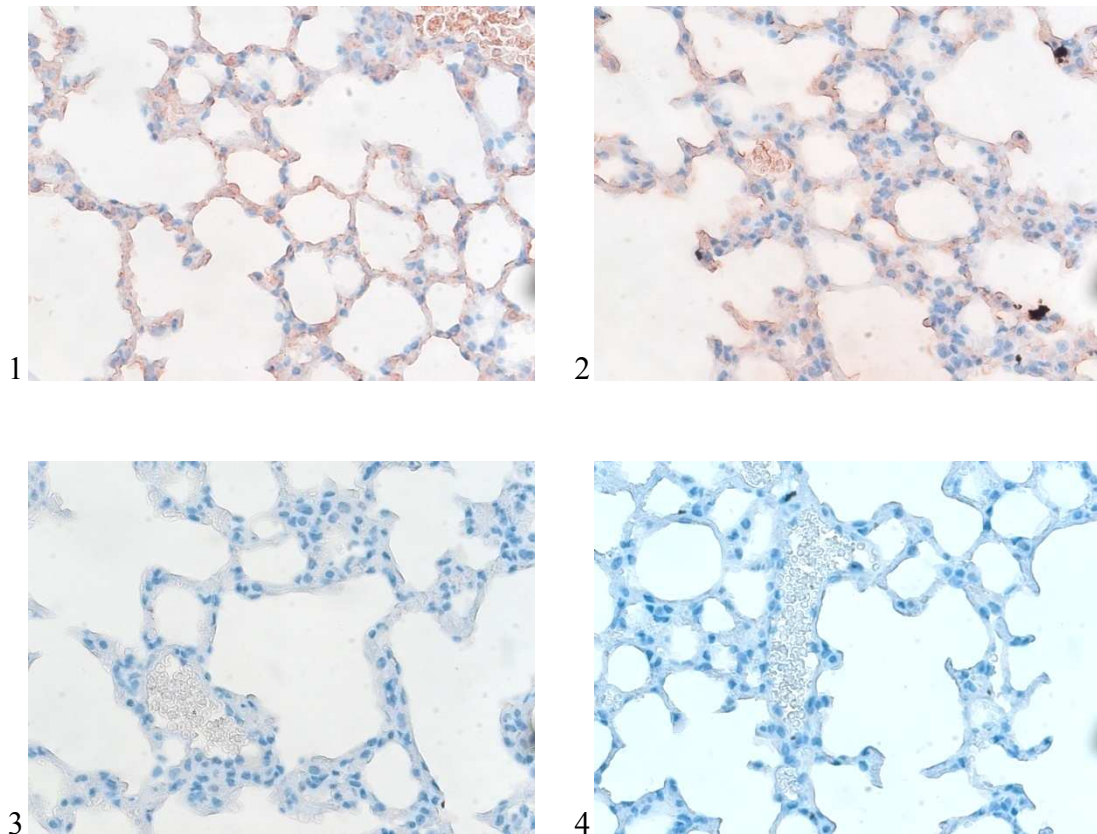


**Abbildung 17: IL-13R $\alpha$ 2-mRNA-Expression in wt- und SP-A<sup>-/-</sup> Tieren**

IL-13R $\alpha$ 2-mRNA ließ sich nur bei den Asthmatischen der Kontroll- und der SP-A<sup>-/-</sup> Gruppe nachweisen. Dabei zeigte sich eine verminderte Expression bei den k.o.-Tieren.

#### 3.4.4 Immunhistochemische Detektion von IL-13R $\alpha$ 2

Die für IL-13R $\alpha$ 2 durchgeführte immunhistochemische Detektion zeigte zur RT-PCR konträre Ergebnisse. So zeigte sich sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den SP-A<sup>-/-</sup> und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren in den mit PBS/PBS und PBS/OVA behandelten Gruppen ein homogenes Expressionsmuster im Alveolarbereich und in den luftleitenden Lungenabschnitten. Im Gegensatz hierzu konnte der Rezeptor weder bei den mit OVA/OVA behandelten Wildtyp-tieren noch bei den mit OVA/OVA behandelten Knock out Tieren immunhistologisch dargestellt werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Immunhistochemische Detektions für IL-13R $\alpha$ 2 im Alveolarraum**

**1 wt PBS/PBS**

**2 SP-A-/- PBS/PBS**

**3 SP-A-/- OVA/OVA**

**4 SP-D-/- OVA/OVA**

Die immunhistochemische Detektion von IL-13-R $\alpha$ 2 zeigte eine homogene Nachweisbarkeit bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren der wt- und SP-A-/- Gruppe (blassrosa Zytoplasma in 1 und 2), wohingegen die Detektion des Rezeptors bei den mit OVA/OVA behandelten Asthmatisieren nicht gelang(3,4).

### **3.4.5 Bestimmung von IL-13 mit dem CBA-Flex Cytometer**

Um die Bedeutung von SP-A und SP-D auf den Interleukin-13 Spiegel im Plasma und in der bronchoalveolären Lavage der chronisch erkrankten Mäusen zu ermitteln, wurden beide Medien einer Flexanalyse unterzogen. Im Rahmen derer konnten allerdings weder in der Gruppe der Wildtyp- noch in den Gruppen der knock out-Tiere messbare Spiegel ermittelt werden.

### **3.5 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu TNF $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2**

Die Bedeutung von SP-D und SP-A auf die Regulation von TNFR1, TNFR2 und TNF $\alpha$  wurde im Rahmen dieser Arbeit auf molekulargenetische Ebene mittels RT-PCR und auf zellulärer Ebene immunhistologisch untersucht. Die Bestimmung der Konzentration von TNF $\alpha$  in Plasma und BAL erfolgte mittels CBA-Flex Analyse.

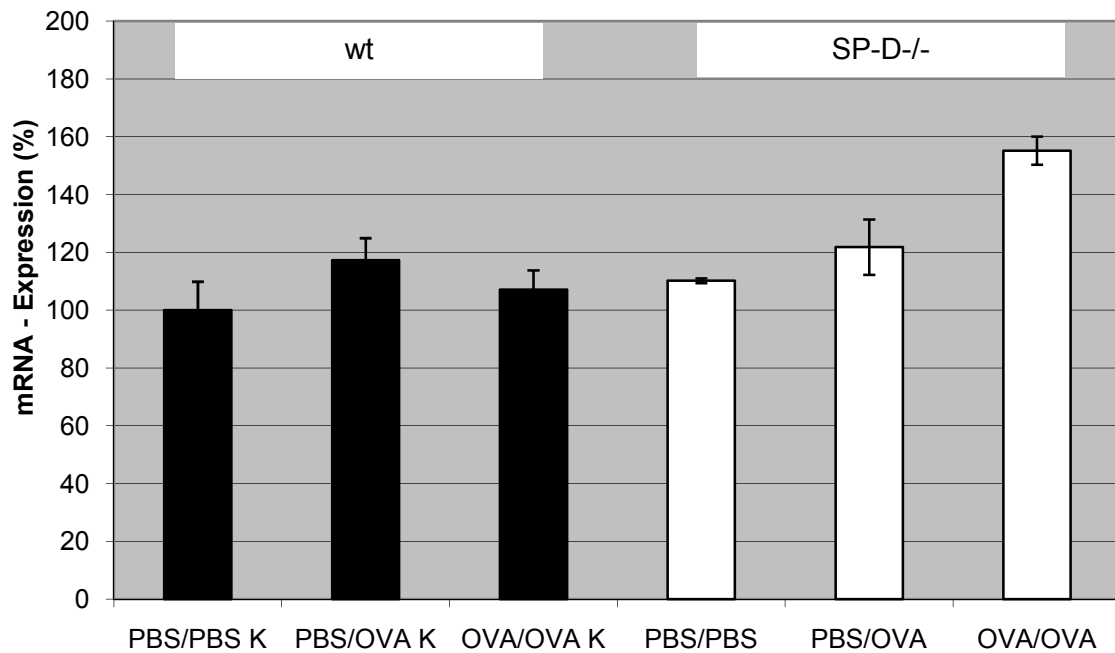
#### **3.5.1 mRNA-Expression von TNFR1**

Bei der molekulargenetischen Untersuchung der TNFR1-mRNA-Expression zeigte sich, dass die Wildtypiere in allen drei Behandlungsgruppen annähernd äquivalente Spiegel exprimieren (wt PBS/PBS 100%  $\pm$  18,7%; wt PBS/OVA 117,3%  $\pm$  15,2%, wt OVA/OVA 107,1%  $\pm$  13,4%).

Bei der Betrachtung der SP-D-/- Tiere zeigte sich eine Zunahme der TNFR1-mRNA-Expression bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren (155,2%  $\pm$  9,8%) im Vergleich zu den mit PBS/PBS bzw. PBS/OVA behandelten Tieren (110,2%  $\pm$  1,7% bzw. 121,8%  $\pm$  19,2%).

Die graphische Darstellung findet sich in Abbildung 19.

### RT-PCR TNFR1, Typ II Pneumozyten bei Wildtyp- und SP-D-/- Tieren

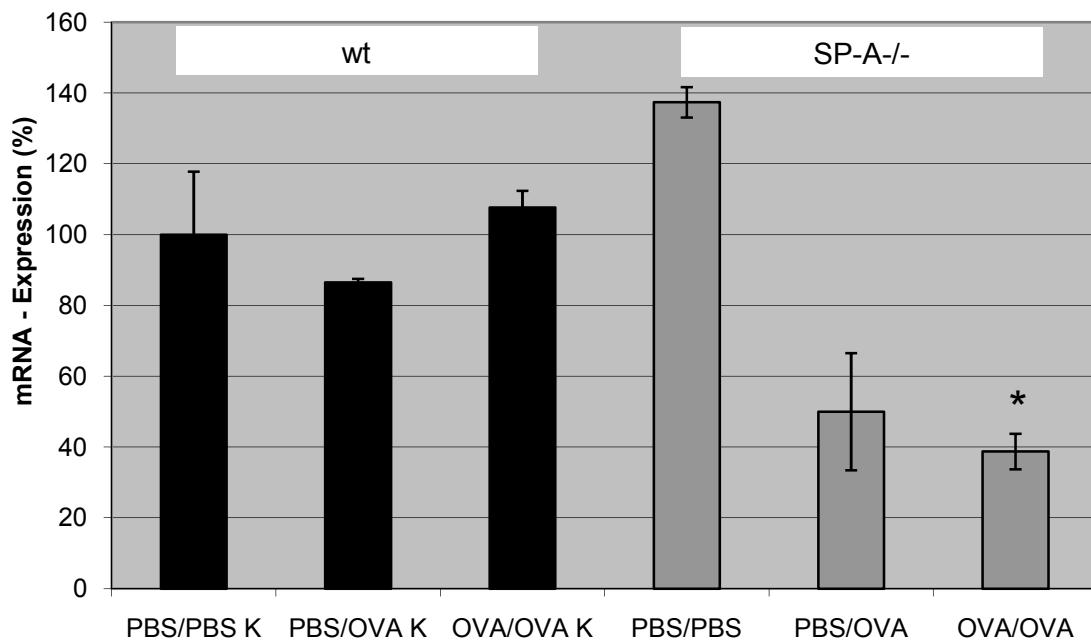


**Abbildung 19: TNFR1-mRNA-Expression in wt- und SP-D-/- Tieren**

Innerhalb der wt-Tiergruppe zeigt sich eine homogene TNFR1-mRNA-Expression. Bei den SP-D-/- Tieren zeigt sich, dass die Behandlung mit OVA zu einer verstärkten TNFR1-mRNA-Expression führt.

Bei den SP-A-/- Tieren fanden wir ein - verglichen mit den SP-D-/- Tieren - veränderte mRNA-Expression (Abbildung 20): Hier zeigen die mit PBS/PBS behandelten Tiere ( $137,37\% \pm 8,58\%$ ) im Vergleich mit den mit PBS/PBS behandelten Wildtyptieren ( $100\% \pm 35,6\%$ ) einen erhöhten TNFR1-mRNA-Spiegel. Weiterhin zeigte sich sowohl im Vergleich mit den Wildtyptieren als auch im Vergleich mit den PBS/PBS-Tieren der Knock out Gruppe eine signifikante ( $p = 0,005$  im Vergleich mit wt OVA/OVA und  $p = 0,009$  im Vergleich mit SP-A-/- PBS/PBS Tieren;\*) mRNA-Abnahme bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren ( $38,72\% \pm 11,01\%$ ).

### RT-PCR TNFR1, Typ II Pneumozyten bei Wildtyp- und SP-A/- Tieren



**Abbildung 20: TNFR1-mRNA-Expression in wt- und SP-A/- Tieren**

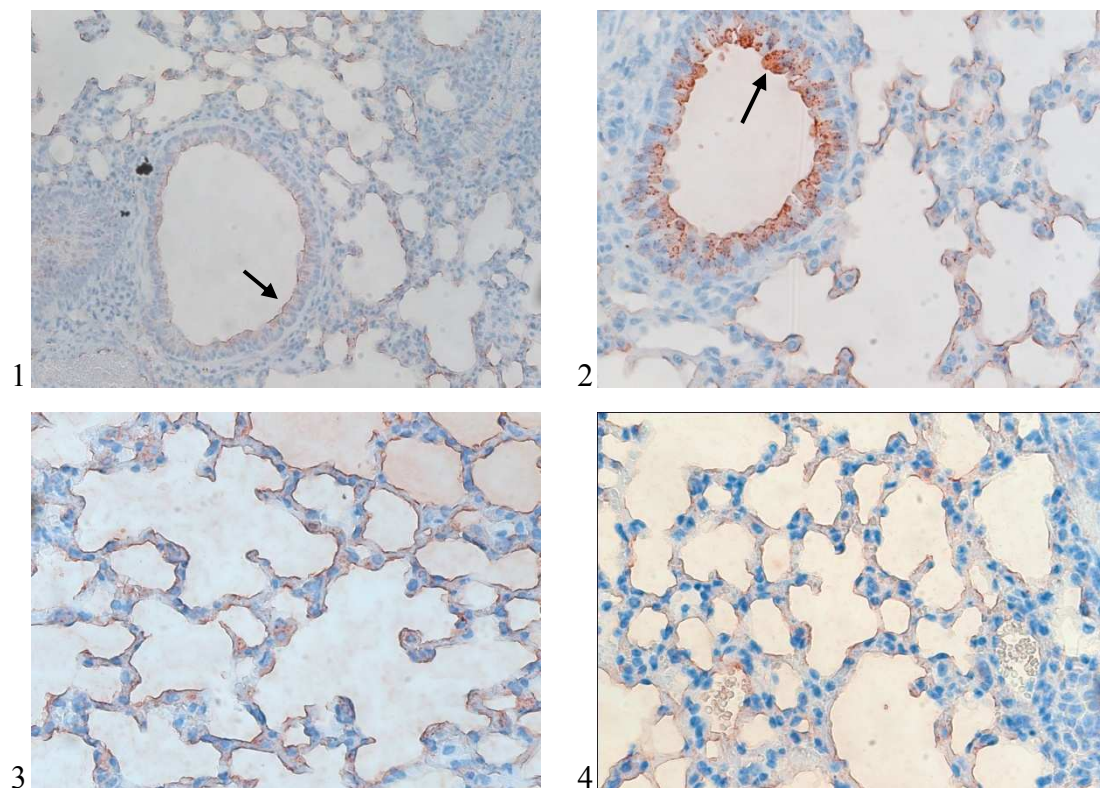
Bei den SP-A/- Tieren zeigt sich eine verstärkte TNFR1-mRNA-Expression bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren. Die Behandlung mit OVA führt bei den SP-A/- Tieren zu einer verminderten Expression des Rezeptors, v.a. bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren der SP-A/- Gruppe zeigt sich eine ggü. der wt-Tier-Gruppe verminderte TNFR1-mRNA-Expression (\*).

### 3.5.2 Immunhistochemische Detektion von TNFR1

Die in der immunhistochemischen Untersuchung ermittelten Ergebnisse bzgl. der Nachweisbarkeit von TNFR1 spiegeln die mittels RT-PCR gewonnenen Ergebnisse auf zellulärer Ebene wider. So ließ sich der Rezeptor bei den Wildtyp-Tieren homogen anfärben.

In der Gruppe der SP-D -/- Tiere zeigte sich eine verstärkte Anfärbbarkeit vor allem in den luftleitenden Abschnitten der mit OVA sensibilisierten und provozierten Tiere. Die Anfärbbarkeit bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren entsprach der der Wildtyp-Tiere. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung an Proben von SP-A/- Tieren zeigten eine im Vergleich zu PBS/PBS Tieren verminderte Rezeptornachweisbarkeit auf zellulärer Ebene bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren.

Abbildung 21 zeigt die immunhistochemische Detektionsfärbung von TNFR1 bei Wildtyp-, SP-A<sup>-/-</sup> und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren.



**Abbildung 21: Immunhistochemische Detektionsfärbung von TNFR1**

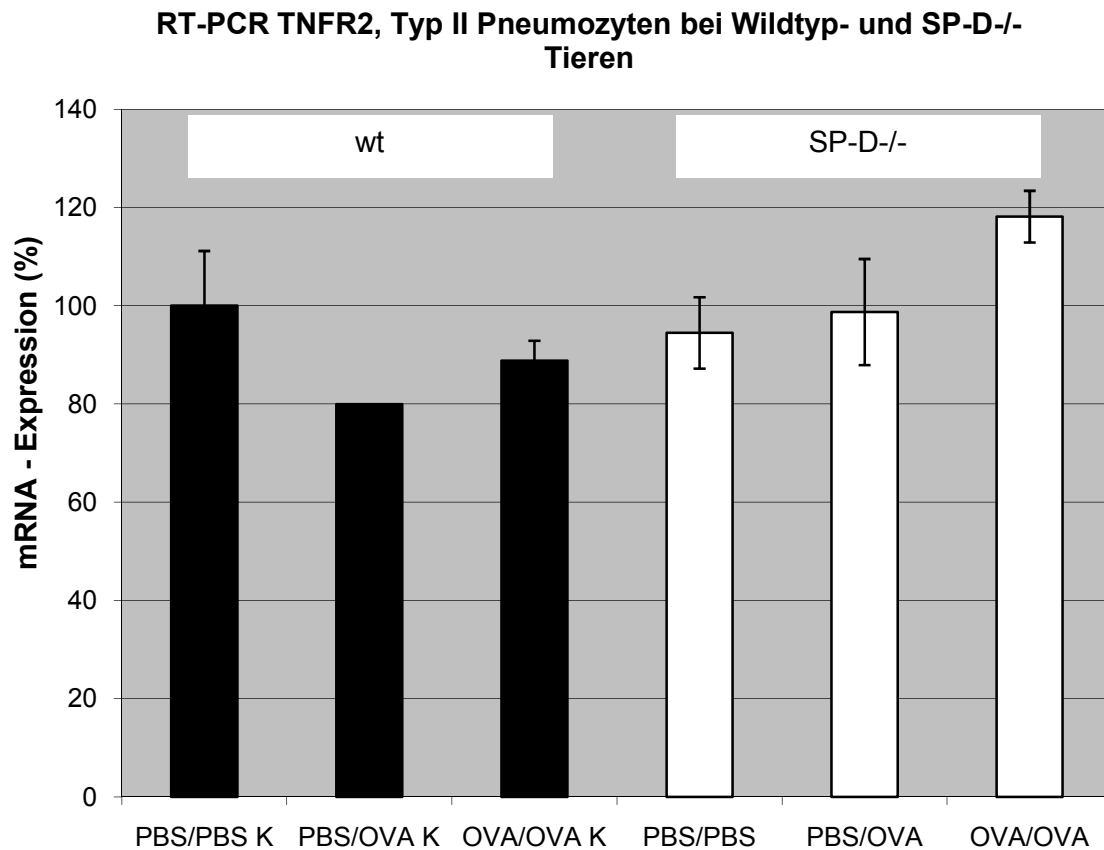
<b>1 SP-D<sup>-/-</sup> PBS/PBS</b>	<b>2 SP-D<sup>-/-</sup> OVA/OVA in luftleitenden Abschnitten</b>
<b>3 SP-A<sup>-/-</sup> PBS/PBS</b>	<b>3 SP-A<sup>-/-</sup> OVA/OVA im Alveolarraum</b>

Verstärkte immunhistochemische Detektion von TNFR1 in den luftleitenden Abschnitten der SP-D<sup>-/-</sup> Tiere (→ in 2).

### 3.5.3 mRNA-Expression von TNFR2

Bei der Untersuchung von TNFR2 mittels RT-PCR zeigte sich bei den Wildtyptieren eine äquivalente mRNA-Expression in allen drei Behandlungsgruppen.

In den mit OVA/OVA behandelten Tieren der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe zeigte sich im Vergleich zu den wt-OVA/OVA-Tieren eine Zunahme der TNFR2-mRNA-Expression ( $118,16\% \pm 10,5\%$  versus  $88,79\% \pm 8,21\%$ ). Abbildung 22 dient der graphischen Veranschaulichung des Sachverhaltes.

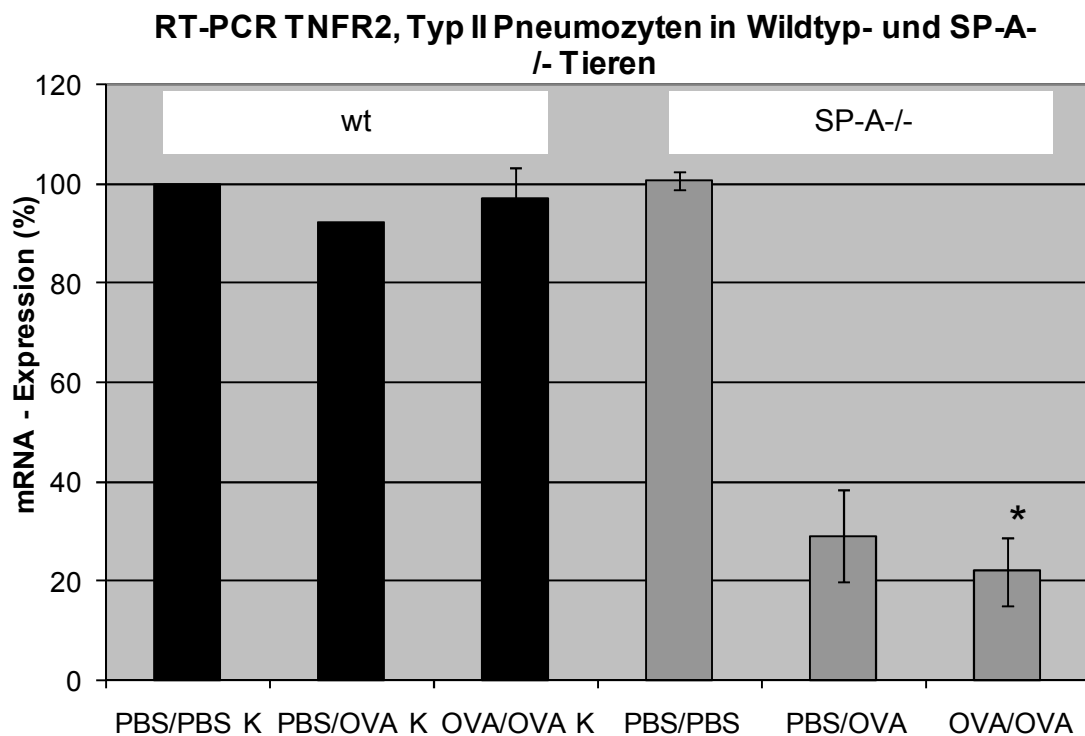


**Abbildung 22: TNFR2-mRNA-Expression in wt- und SP-D-/- Tieren**

Die Behandlung der wt-Tiere mit OVA führt zu keiner relevanten Veränderung des TNFR2-mRNA-Expressionsmusters, wohingegen es bei den mit OVA behandelten Tieren der SP-D-/- Gruppe zu einer gesteigerten TNFR2-mRNA-Expression kommt.

Innerhalb der SP-A-/- Gruppe zeigte sich ein konträres Bild: die mit OVA sensibilisierten und provozierten Tiere zeigten einen signifikanten ( $p=0,01$  im Vergleich mit SP-A-/- PBS/PBS Tieren und  $p = 0,005$  im Vergleich mit wt OVA/OVA Tieren) Abfall der TNFR2-mRNA-Expression auf  $21,95\% \pm 13,55\%$  (Abbildung 23). Dieser Expressionsabfall war bereits bei den mit PBS/OVA behandelten Tiere der Knock out Gruppe zu verzeichnen (PBS/OVA  $29,12\% \pm 18,5\%$ ).

Zu den Wildtyptieren äquivalente mRNA-Spiegel waren bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren ( $100,62\% \pm 3,67\%$ ) der SP-A-/- Gruppe zu verzeichnen.



**Abbildung 23: TNFR2-mRNA-Expression in wt- und SP-A-/- Tieren**

Die Behandlung mit OVA führt innerhalb der SP-A-/- Gruppe zu einer signifikant verminderten TNFR2-mRNA-Expression innerhalb der Asthmagruppe (OVA/OVA).

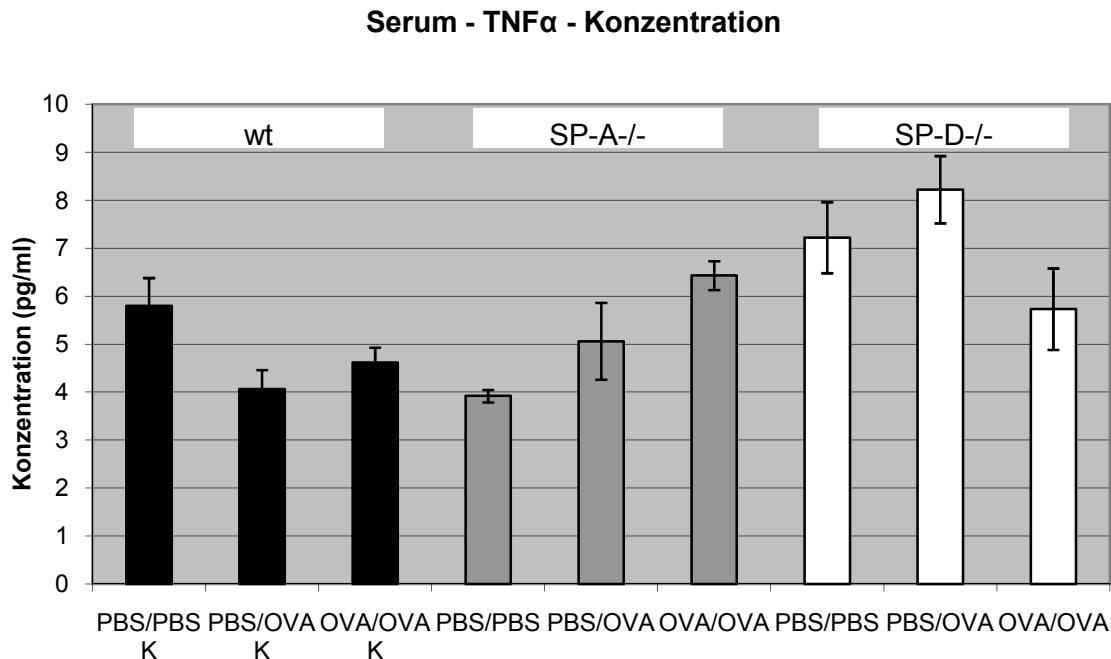
### 3.5.4 Bestimmung von TNF $\alpha$ in Plasma und BAL mittels CBA-Flex-Cytometer

Innerhalb der Wildtypgruppe fanden sich die höchsten TNF $\alpha$ -Spiegel im Plasma der mit PBS/PBS behandelten Tiere (5,8 pg/ml  $\pm$  1,16 pg/ml). Die mit OVA provozierten wt-Tiere zeigten geringere Plasmakonzentrationen des Zytokins (wt PBS/OVA 4,06 pg/ml  $\pm$  0,8 pg/ml; wt OVA/OVA 4,62 pg/ml  $\pm$  0,62 pg/ml).

Die mit PBS/PBS behandelten Tiere der SP-D-/- Gruppe weisen eine im Vergleich zu den wt-PBS/PBS-Tieren erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentration im Plasma auf (7,22 pg/ml  $\pm$  1,48 pg/ml vs. 5,8 pg/ml  $\pm$  1,16 pg/ml; Abbildung 24). Analog zu Gruppe der Wildtyptiere fällt auch in der SP-D-/- Gruppe der Zytokinspiegel der mit OVA/OVA behandelten Tiere im Vergleich zu den PBS/PBS Tieren auf 5,73 pg/ml  $\pm$  1,7 pg/ml ab. Innerhalb der SP-D-/- Gruppe weisen die mit PBS/OVA behandelten Tiere die höchste TNF $\alpha$ -Konzentration auf (8,22 pg/ml  $\pm$  1,4 pg/ml).



In der Gruppe der SP-A<sup>-/-</sup> zeigt sich ein im Vergleich mit den Wildtyptieren konträres Ergebnis: die mit OVA sensibilisierten und provozierten Tiere weisen im Vergleich zu den mit PBS/PBS behandelten Tieren eine höhere TNF $\alpha$ -Plasmakonzentration auf (6,43 pg/ml  $\pm$  0,59 pg/ml vs. 3,92 pg/ml  $\pm$  0,25 pg/ml).

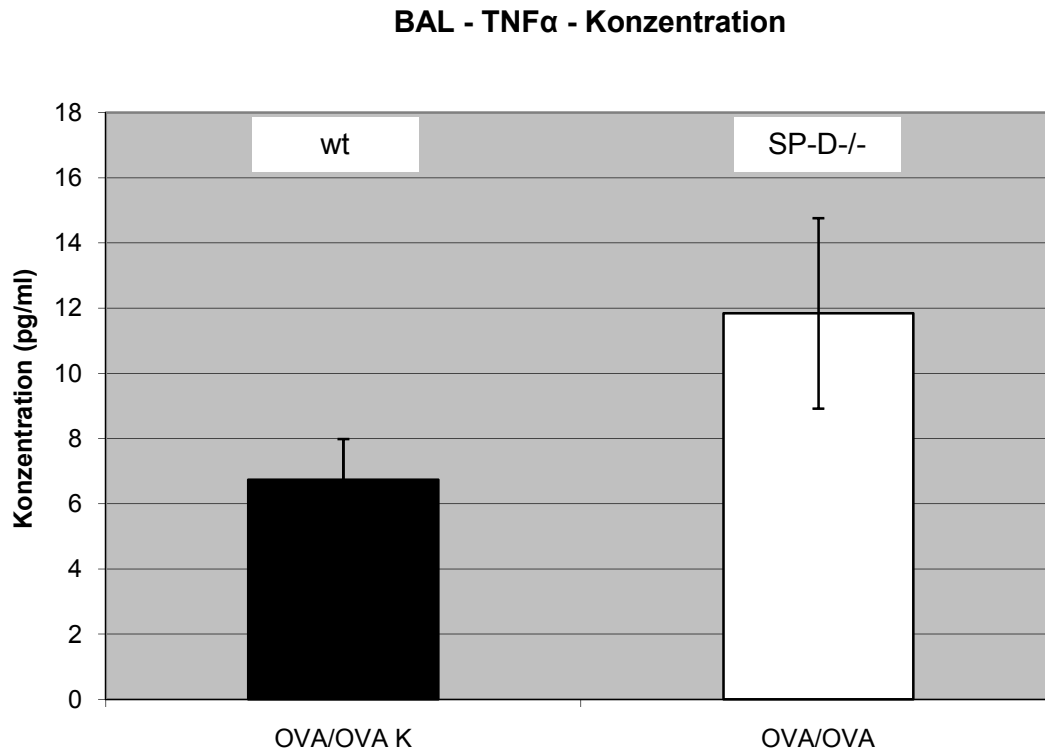


**Abbildung 24: TNF $\alpha$  – Konzentration im Plasma von wt-, SP-A<sup>-/-</sup> und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren**

In der Gruppe der wt-Tiere zeigten sich verminderte TNF $\alpha$ -Spiegel bei den mit OVA behandelten Tieren. Innerhalb der SP-A<sup>-/-</sup> Tiere zeigte sich bei den mit OVA behandelten Tieren eine gesteigerte TNFR2-mRNA-Expression. Bei den SP-D<sup>-/-</sup> Tieren zeigten sich ggü. den wt-Tieren bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren gesteigerte TNF $\alpha$ -Spiegel. Bei den Asthmatischen der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe zeigte sich eine ggü. den PBS/OVA-Tieren der gleichen Gruppe verminderte TNF $\alpha$ -Serumkonzentration.

Die Messung von TNF $\alpha$  in bronchoalveolärer Lavage zeigte bei den OVA/OVA Tieren der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe im Vergleich zu den wt OVA/OVA Tieren deutlich erhöhte Werte: OVA/OVA 11,84 pg/ml  $\pm$  5,84 pg/ml vs. wt OVA/OVA 6,74 pg/ml  $\pm$  2,5 pg/ml (Abbildung 25).

Innerhalb der anderen Behandlungsgruppen (PBS/PBS od. PBS/OVA) konnte TNF $\alpha$  nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis des Zytokins in der Lavage von SP-A<sup>-/-</sup> Tieren war aufgrund des begrenzten Probenmaterials ebenfalls nicht möglich.



**Abbildung 25: TNF $\alpha$  – Konzentration in bronchoalveolärer Lavage von wt- und SP-D-/- Tieren**

Die Behandlung mit OVA führt bei den SP-D-/- Tieren zu einer erhöhten TNF $\alpha$ -Konzentration in bronchoalveolärer Lavage verglichen mit mit den Asthmaticern der wt-Gruppe.

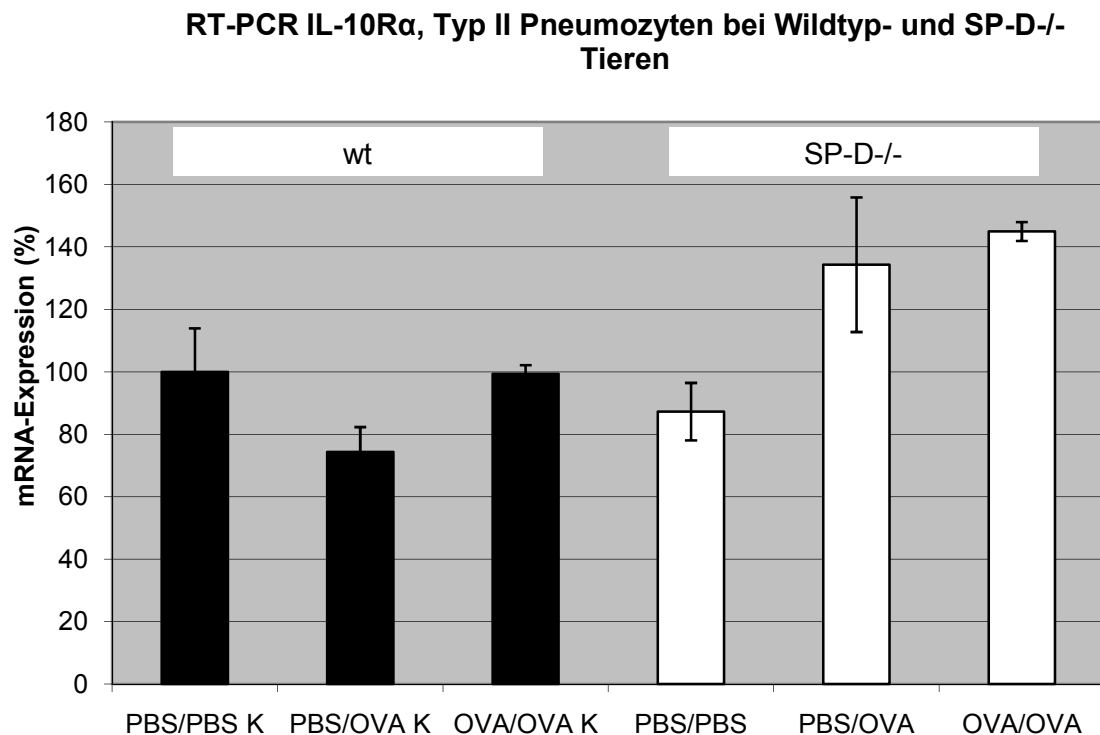
### 3.6 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu IL-10, IL-10R $\alpha$ und IL-10R $\beta$

Da IL-10 über immunsupprimierende Eigenschaften verfügt und z.B. über verschiedene Signaltransduktionswege die Produktion proinflammatorischer Zytokine inhibiert, wurde die Regulation des Botenstoffs und seiner Rezeptoren IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  durch die Surfactantproteine A und D im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

#### 3.6.1 mRNA-Expression von IL-10R $\alpha$

Bei der Bestimmung der IL-10R $\alpha$  – mRNA-Bestimmung wiesen die Wildtypiere ein homogenes Expressionsmuster auf (Abbildung 26). Lediglich die mit PBS/OVA behandelten wt-Tiere zeigten einen geringen Abfall auf  $74,34\% \pm 14,9\%$ .

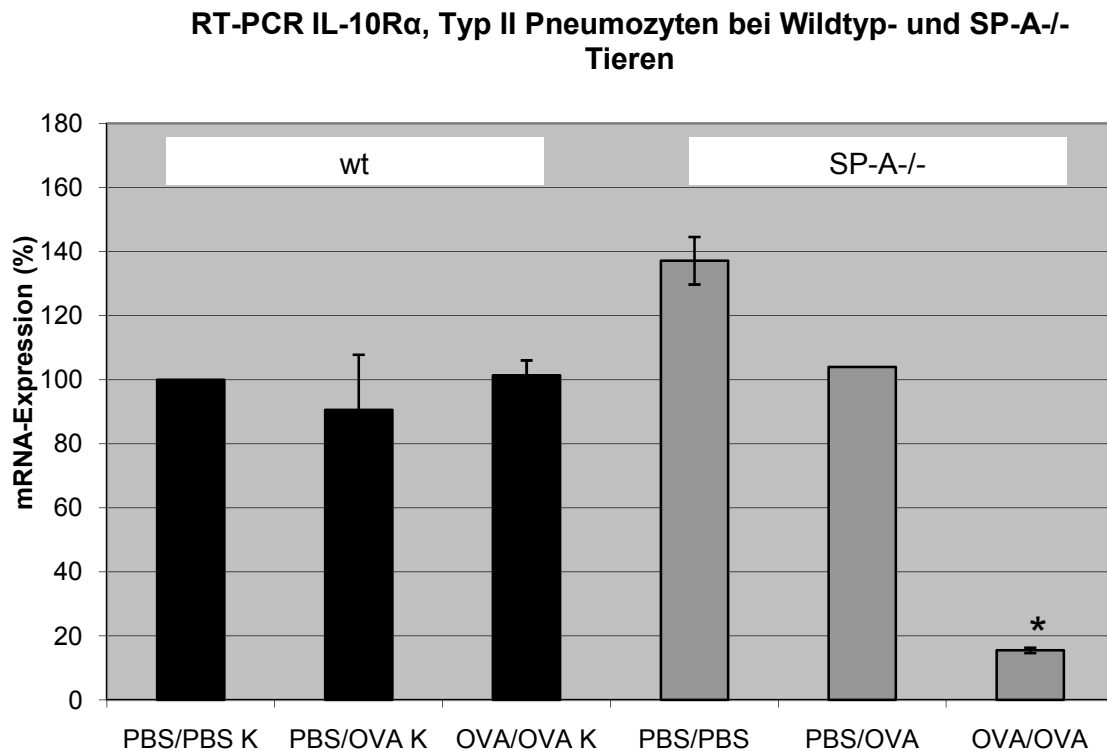
Betrachtet man nun die SP-D<sup>-/-</sup> Tiere, fällt eine kontinuierlich ansteigende IL-10R $\alpha$ -mRNA – Expression bei den Tieren auf, die mit OVA sensibilisiert und provoziert wurden. Lagen die Expressionswerte in der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe bei den PBS/PBS – Tieren bei 87,25%  $\pm$  18,41%, konnten bei den mit OVA provozierten Tiere Werte von 134,28%  $\pm$  43,15% und bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten Tieren Werte von 144,94%  $\pm$  6,11% ermittelt werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26: IL-10R $\alpha$ -mRNA-Expression in wt- und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren**

Innerhalb der wt-Gruppe zeigt sich ein homogenes IL-10R $\alpha$ -Expresionsmuster. Die Behandlung mit OVA führt bei den SP-D<sup>-/-</sup>Tieren zu einer verstärkten Expression des Rezeptors.

Vergleicht man die IL-10R $\alpha$ -mRNA-Expressionswerte der Wildtyptiere mit denen der SP-A<sup>-/-</sup> Tiere, zeigt sich ein signifikanter Abfall ( $p < 0,001$ ;) bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren (Abbildung 27). So lassen sich bei den SP-A<sup>-/-</sup> OVA/OVA Werte von 15,49%  $\pm$  1,7% finden, wohingegen man bei den mit OVA/OVA behandelten wt-Tieren Werte von 101,33%  $\pm$  9,4% findet (Abbildung 27). Ferner konnten bei den mit PBS sensibilisierten und provozierten Tieren der SP-A<sup>-/-</sup> Gruppe im Vergleich zu den äquivalent behandelten Tieren der Kontrollgruppe höhere Expressionswerte für IL-10R $\alpha$  nachgewiesen werden (137,15%  $\pm$  14,85% vs. 100%).

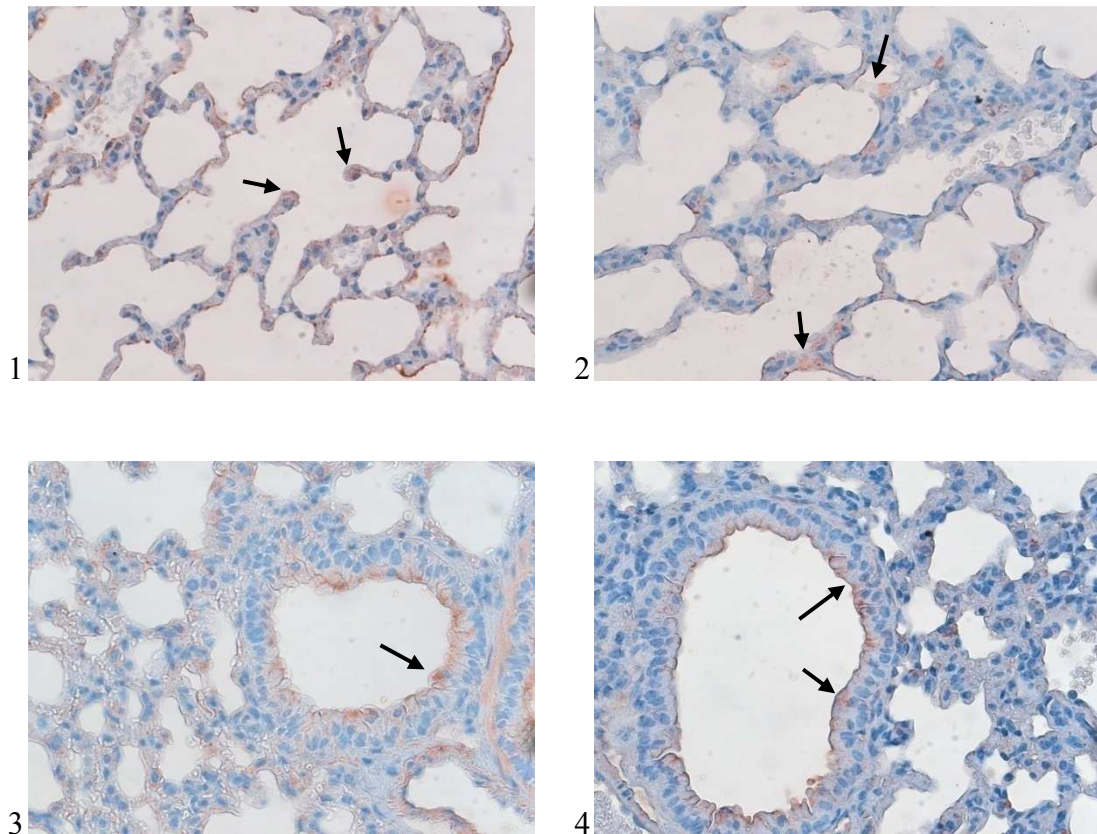


**Abbildung 27: IL-10R $\alpha$ -mRNA-Expression in wt- und SP-A-/- Tieren**

Bei den wt-Tieren zeigte sich ein homogenes Expressionsmuster von IL-10R $\alpha$ . Innerhalb der SP-A-/- Gruppe zeigte sich bei den mit PBS/PBS behandelten Tieren eine ggü. der wt-Gruppe erhöhte IL-10R $\alpha$ -mRNA-Expression. Bei den OVA/OVA-Tieren der SP-A-/- Gruppe zeigte sich eine signifikant verminderte Rezeptorexpression (\*).

### 3.6.2 Immunhistochemische Detektion von IL-10R $\alpha$

Die immunhistologische Detektion für IL-10R $\alpha$  zeigte im Bereich der Alveolen sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den SP-A-/- und SP-D-/- ein homogenes Expressionsmuster in allen 3 Behandlungsgruppen. Lediglich bei den mit PBS/OVA behandelten Tieren der SP-A-/- Gruppe konnte eine verstärkte Detektion des Rezeptors in den luftleitenden Abschnitten gezeigt werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Immunhistochemische Detektion von IL-10R $\alpha$**

**1 SP-D-/- OVA/OVA**

**2 SP-D-/- PBS/PBS im Alveolarraum**

**3 SP-A-/- PBS/OVA**

**4 wt – PBS/OVA im luftleitenden Abschnitt**

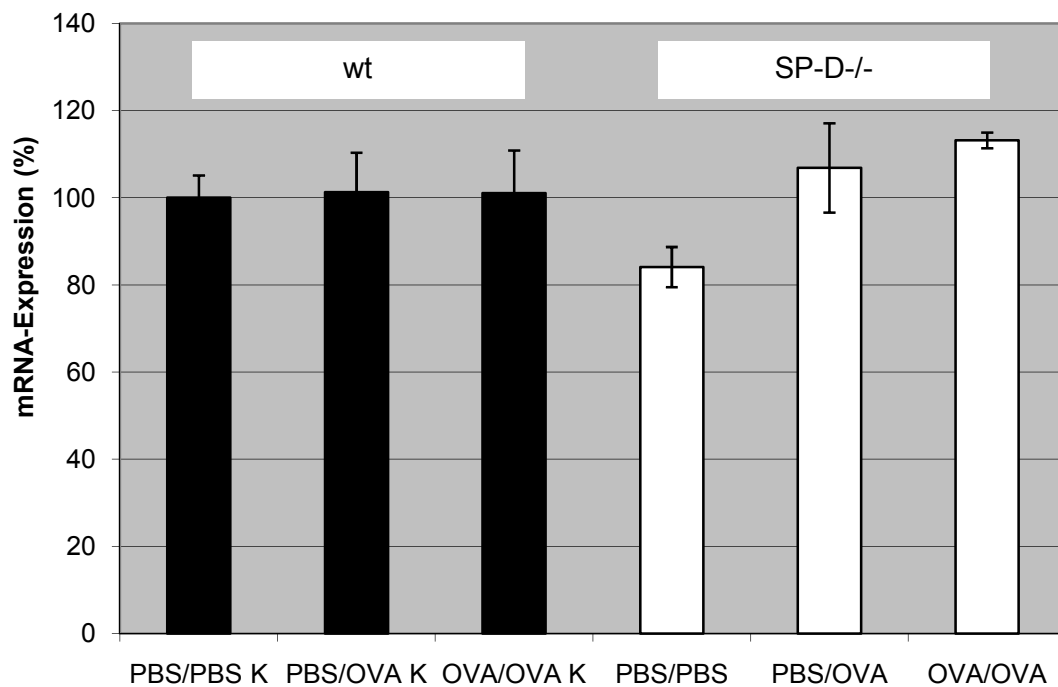
Es zeigt sich eine in allen Behandlungsgruppen äquivalente Expression von IL-10R $\alpha$  auf Zellebene.

### 3.6.3 mRNA-Expression von IL-10R $\beta$

Die IL-10R $\beta$ -mRNA-Expressionsanalyse ergab in allen 3 Behandlungsgruppen der Wildtyptiere ein homogenes Ausprägungsmuster (Abbildung 29).

Verglichen mit den wt PBS/PBS-Tieren weisen die PBS/PBS-Tiere der SP-D-/- Gruppe einen verminderten IL-10R $\beta$ -mRNA-Spiegel auf ( $100\% \pm 10,17\%$  vs.  $84,09\% \pm 9,22\%$ ). Es zeigt sich innerhalb der SP-D-/- Gruppe ein IL-10R $\beta$ -mRNA-Anstieg mit Maximum bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten Tieren (PBS/OVA  $106,84\% \pm 20,47\%$ ; OVA/OVA  $113,15 \pm 3,6\%$ ).

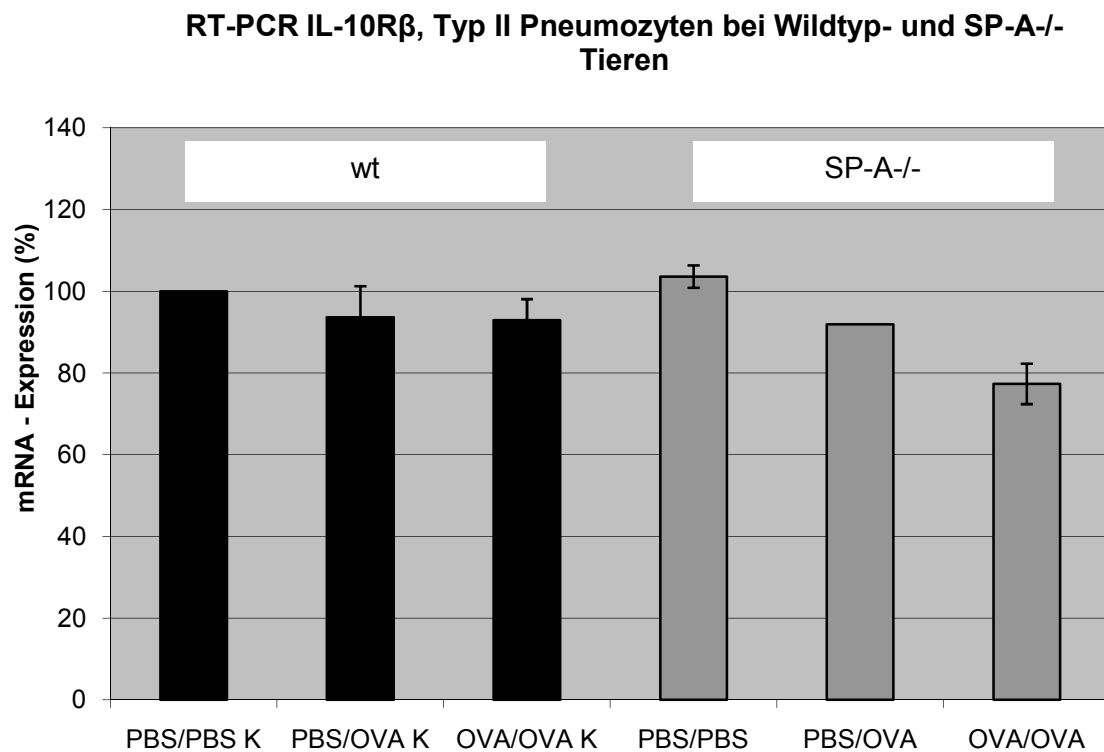
### RT-PCR IL-10R $\beta$ , Typ II Pneumozyten bei Wildtyp- und SP-D-/- Tieren



**Abbildung 29: IL-10R $\beta$ -mRNA-Expression in wt- und SP-D-/- Tieren**

Innerhalb der wt-Gruppe zeigt sich ein homogenes IL-10R $\beta$ -mRNA-Expressionsmuster in allen drei Behandlungsgruppen. Die Behandlung mit OVA führt bei den SP-D-/- Tieren zu einer gesteigerten IL-10R $\beta$ -Expression.

Betrachtet man die Ergebnisse der RT-PCR für IL-10R $\beta$ , die bei den SP-A-/- Tieren erzielt wurden, wird deutlich, dass die Expressionswerte bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren im Vergleich zu den Tieren der Wildtypgruppe auf  $77,34\% \pm 9,92\%$  abfallen (Abbildung 30).



**Abbildung 30: IL-10R $\beta$ -mRNA-Expression in wt- und SP-/- Tieren**

Behandlung mit OVA führt bei SP-A-/- Tieren zu einer leicht verminderten IL-10R $\beta$ -mRNA-Expression.

#### **3.6.4 Bestimmung der IL-10-Konzentration in Plasma und BAL mittels CBA-Flex-Cytometer**

Um zu zeigen welche Bedeutung die beiden Surfactantproteine A und D auf den IL-10-Spiegel haben, wurden die gewonnenen Plasma- und Lavageproben einer Flexanalyse unterzogen.

Dabei konnten leider aufgrund des limitierten Probenmaterials weder bei den Wildtyptieren noch bei den SP-A-/- bzw. SP-D-/- Tieren messbare Zytokin-konzentrationen ermittelt werden.

### **3.7 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu SP-D**

Das Surfactantprotein D stellt sowohl im Rahmen inflammatorischer als auch im Rahmen nicht-pathologischer Prozesse einen wichtigen Immunmodulator dar. Aus diesem Grund wurde seine Bedeutung für chronisches Asthma im Kontext dieser Arbeit untersucht.

Anhand von RT-PCR und immunhistochemischer Detektionsfärbungen wurde untersucht, welche Konsequenzen sich aus der Ausschaltung des SP-A-Gens in Bezug auf die SP-D- Regulation ergeben.

#### **3.7.1 mRNA-Expression von SP-D in Wildtyp- und SP-A/- Tieren**

Es zeigte sich bereits bei den lediglich mit OVA sensibilisierten Wildtyptieren eine signifikante Hochregulation ( $p = 0,005$ ) der SP-D-mRNA-Expression gegenüber den mit PBS/PBS behandelten Tieren (Abbildung 31). Die mRNA-Expression der wt OVA/OVA- Tiere war gegenüber der wt PBS/OVA-Tiere vermindert ( $551,64\% \pm 38,88\%$  vs.  $726,3\% \pm 31,07\%$ ), aber im Vergleich zu den wt PBS/PBS-Tieren signifikant ( $p = 0,004$ ) erhöht (wt PBS/PBS  $100\% \pm 32,77\%$ ).

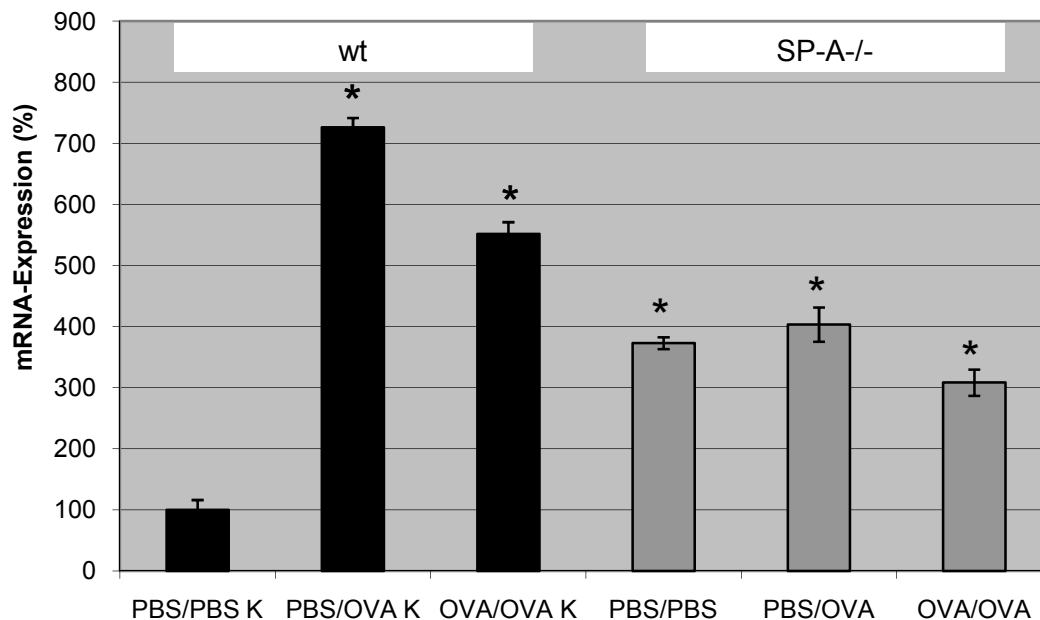
Stellt man nun der Gruppe der Wildtyptiere die Gruppe der SP-A/- Tiere gegenüber zeigt sich:

1. Eine gegenüber den wt PBS/OVA bzw. wt OVA/OVA Tieren verminderte SP-A mRNA-Expression mit signifikanten Unterschied zwischen wt PBS/OVA und OVA/OVA-Tieren ( $p = 0,006$ ) und signifikantem Unterschied zwischen wt OVA/OVA und OVA/OVA-Tieren ( $p = 0,014$ )
2. Eine gegenüber den wt PBS/PBS Tieren signifikant erhöhte SP-D-mRNA-Expression:  
wt PBS/PBS  $100\% \pm 32,77\%$  vs. SP-A/- PBS/PBS  $373,32\% \pm 19,31\%$   
( $p = 0,016$ )  
wt PBS/PBS  $100\% \pm 32,77\%$  vs. SP-A/- PBS/OVA  $403,55\% \pm 56,17\%$   
( $p = 0,043$ )



wt PBS/PBS  $100\% \pm 32,77\%$  vs SP-A<sup>-/-</sup> OVA/OVA  $308,46\% \pm 43,13\%$   
( $p = 0,042$ )

### RT-PCR SP-D, Typ II Pneumozyten bei Wildtyp- und SP-A<sup>-/-</sup> Tieren

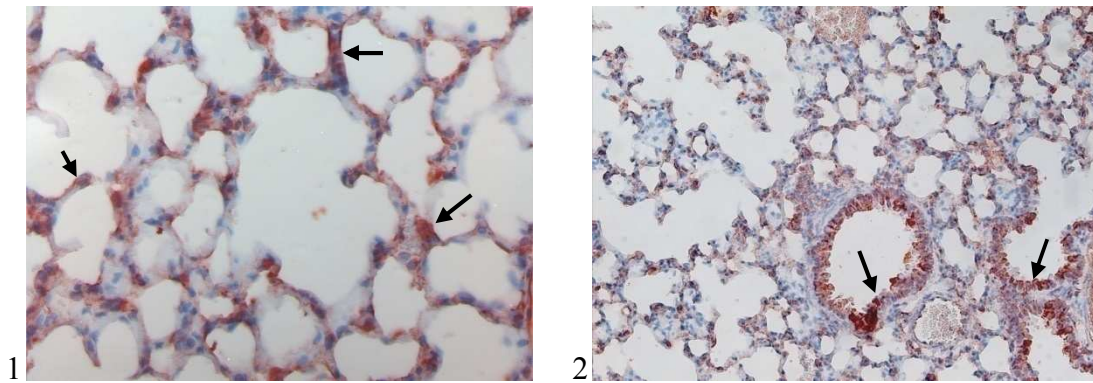


**Abbildung 31: SP-D-mRNA-Expression in wt- und SP-A<sup>-/-</sup> Tieren**

Innerhalb der wt-Gruppe kommt es nach Behandlung mit OVA zu einer signifikant erhöhten SP-D-mRNA-Expression. Auch bei den SP-A<sup>-/-</sup> Tieren zeigt sich eine homogene, ggü. den PBS/PBS-Tieren der wt-Gruppe verstärkte SP-D-mRNA-Expression.

### 3.7.2 Immunhistochemische Detektion von SP-D

Die immunhistologische Detektion zeigte in allen drei Behandlungsgruppen sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den SP-A<sup>-/-</sup> eine deutliche, mit den Ergebnissen der PCR korrelierende Anfärbbarkeit von SP-D (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Immunhistochemische Detektion für SP-D**

**1 wt PBS/OVA**

**2 SP-A-/- PBS/OVA**

Deutlich erkennbare Anfärbung des gesamten Zytoplasmas im Alveolarraum und in luftleitenden Abschnitten(2) der Lunge.

### **3.8 Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen zu SP-A**

Ebenso wie SP-D spielt das Surfactantprotein A einerseits eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in normalem Lungengewebe und nimmt andererseits Einfluss auf Reaktionskaskaden wie sie bei entzündlichen Prozessen zu beobachten sind. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von SP-D auf die SP-A-Regulation untersucht. Zu diesem Zweck wurden bei Wildtyptieren und SP-D-/- Mäusen mittels RT-PCR und immunhistochemischer Detektionsfärbung die SP-A-Ausprägung auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht.

#### **3.8.1 mRNA-Expression von SP-A in Wildtyp- und SP-D-/- Tieren**

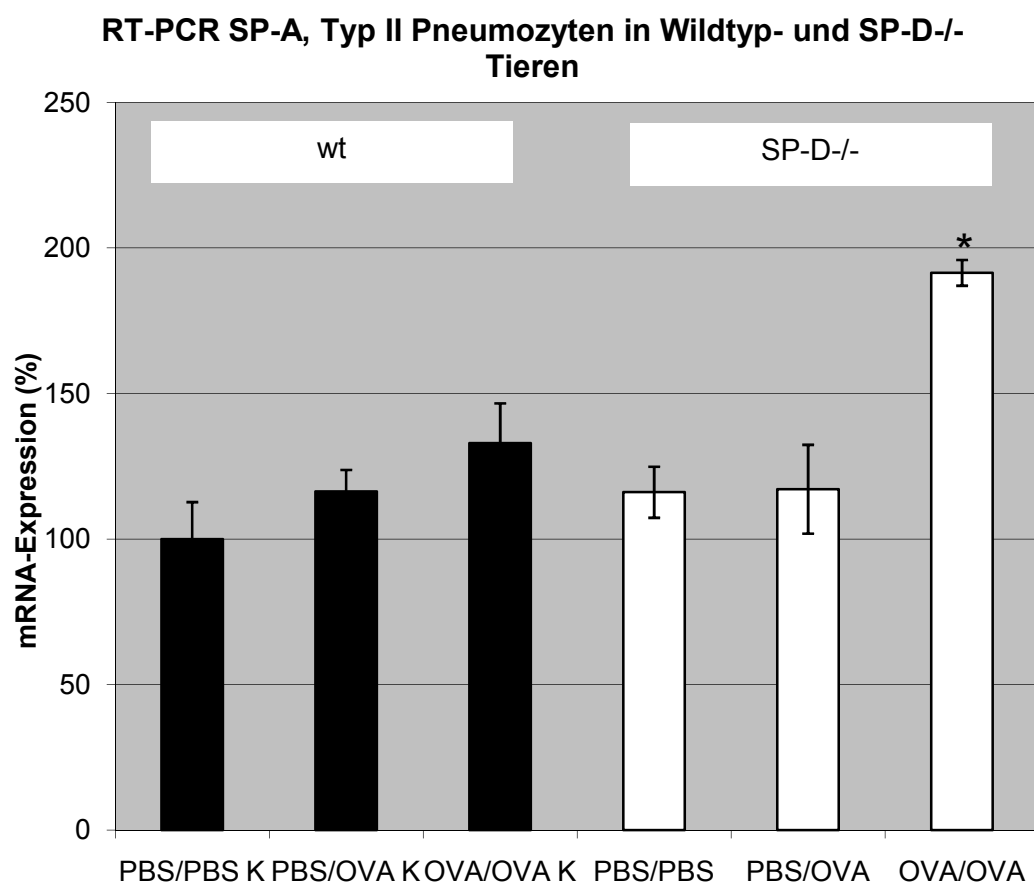
Innerhalb der Kontrollgruppe (Wildtyptiere) zeigte sich mittels RT-PCR eine Mehrexpression bei den Asthmatischen (wt OVA/OVA) im Vergleich zu den mit PBS/PBS behandelten Tieren ( $132,99\% \pm 27,37\%$  vs.  $100\% \pm 25,47\%$ ).

Im direkten Vergleich der Wildtyptiere mit den SP-D-/- Tieren fällt eine signifikante ( $p = 0,026; *$ ) Expressionssteigerung von SP-A-mRNA bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten Tieren ( $191,49\% \pm 8,84\%$ ) gegenüber den mit PBS/PBS ( $100\% \pm 25,47\%$ ) behandelten Tieren auf.

Auch innerhalb der SP-D<sup>-/-</sup> Gruppe weisen die mit OVA/OVA behandelten Mäuse eine signifikant ( $p = 0,023; *$ ) höhere mRNA-Expression gegenüber den PBS/PBS-Tieren ( $116,11\% \pm 17,54\%$ ) auf.

Die gegenüber der wt OVA/OVA-Tiere ermittelte Expressionszunahme bei den SP-D<sup>-/-</sup> OVA/OVA-Tieren ( $132,99\% \pm 27,37\%$  vs.  $191,49\% \pm 8,84\%$ ) erwies sich statistisch als nicht signifikant.

Abbildung 33 dient der graphischen Veranschaulichung der mittels RT-PCR erhobenen Ergebnisse.



**Abbildung 33: SP-A-mRNA-Expression in wt- und SP-D<sup>-/-</sup> Tieren**

Innerhalb der Asthmagruppe kommt es zu einer verstärkten SP-A-mRNA-Expression sowohl bei den wt- als auch bei den SP-D<sup>-/-</sup> Tieren. Bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren der SP<sup>-/-</sup> Gruppe ist diese Mehrexpression als signifikant zu erachten (\*).

### **3.8.2 Immunhistochemische Detektion von SP-A**

In der immunhistochemischen Detektion zeigte sich eine komplette zytoplasmatische Anfärbbarkeit. Allerdings lag keine topographische Anordnung der Färbesignale vor, d.h. es konnte beispielsweise keine grobgranuläre-perinukleäre, basale oder apikale Anfärbbarkeit nachgewiesen werden, so dass die von uns nachgewiesenen Färbesignale als unspezifisch angesehen werden müssen.

## 4 Diskussion

Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften spielen die von Typ-II-Pneumozyten gebildeten Surfactantproteine SP-A und SP-D eine zentrale Rolle in der Initiierung, Chronifizierung, aber auch der Inhibition des chronisch-allergischen Asthma bronchiale.

Die vorliegende Arbeit untersuchte einerseits die Bedeutung der beiden Kollektine auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$  und deren Rezeptoren IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1 sowie andererseits die Bedeutung bei der Expression der antiinflammatorischen Zytokine INF $\gamma$ , IL-10 und deren Rezeptoren IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$ .

### 4.1 Erhöhte Proteinkonzentration in BAL und Serum nach Allergieinduktion

Um den Einfluss von chronisch-allergischem Asthma bronchiale auf die Proteinkonzentration zu ermitteln, bestimmten wir den Gesamtproteingehalt in BAL und Plasma. Dabei konnten wir zeigen, dass die Gesamtproteinmenge in der BAL sowohl bei wt-Tieren als auch bei SP-D $^{-/-}$  und SP-A $^{-/-}$  Tieren nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA anstieg. Dies korreliert mit den von Haczku et. al (2001) publizierten Daten, welche eine erhöhte Proteinkonzentration in der BAL mit *Aspergillus fumigatus* sensibilisierter und provozierte Mäuse nachweisen konnten. Allerdings zeigte sich im Rahmen unserer Untersuchungen weiterhin, dass die Basisrate der Gesamtproteinmenge in der BAL der SP-A $^{-/-}$  und der SP-D $^{-/-}$  Tiere im Vergleich zu den wt-Tieren vermindert war, was unter anderem als Ausdruck einer gestörten Stoffwechselaktivität von Typ-II-Zellen angesehen werden kann und damit den Stellenwert der beiden Surfactantproteine bezüglich der Aufrechterhaltung der normalen Lungenhomöostase bekräftigt. Anders als Tanaka et al. (2000), welche im Plasma zweier an chronisch-allergischem Asthma erkrankter Patienten erhöhte Gesamtproteinspiegel nachgewiesen haben, konnten wir im Plasma der SP-A $^{-/-}$  bzw. SP-D $^{-/-}$  Asthmatiere keine im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant erhöhten Gesamtproteinspiegel nachweisen.

## **4.2 SP-A - mRNA-Expression in Wildtyp- und SP-D-/- Tieren**

In der Gruppe der wt-Mäuse konnten wir keine signifikanten SP-A-mRNA-Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und Asthmatischen finden, was darauf hindeutet, dass das chronisch-allergische Asthma keinen Einfluss auf die SP-A Expression besitzt. Im Gegensatz dazu konnten bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten SP-D-/- Tieren signifikant erhöhte SP-A-mRNA-Spiegel nachgewiesen werden. Äquivalente Beobachtungen diesbezüglich konnten auch von Botas et al. (1998) gemacht werden, die eine Verdopplung der SP-A-mRNA bei SP-D-/- Tieren zeigen konnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der durch OVA hervorgerufene Entzündungsreiz in transgenen Mäusen eine kompensatorisch gesteigerte SP-A-Expression hervorruft und somit die Rolle des Surfactantproteins als Immunmodulator unterstreicht.

## **4.3 SP-D - mRNA-Expression in Wildtyp- und SP-A-/- Tieren**

Im Gegensatz zur SP-A-mRNA-Expression konnten wir bereits bei den wt-Tieren, welche nur mit OVA provoziert, nicht aber sensibilisiert worden waren einen signifikanten Anstieg der SP-D-mRNA-Expression verzeichnen. Dieses Ergebnis korreliert mit Daten von Haczku und Cao et al. (2001,2004), die in ihrem Mausmodell unveränderte mRNA-Mengen für SP-A und deutlich erhöhte SP-D-mRNA Mengen nachwiesen. Ursächlich hierfür scheinen u.a. unterschiedliche, zytokinabhängige Regulationsmechanismen der beiden Kollektine zu sein. So konnte man zeigen, dass die Produktion des proinflammatorischen IL-4 einerseits zu einer kompensatorisch vermehrten SP-D-mRNA-Expression führt und andererseits eine Inhibition der SP-A-mRNA-Synthese zu Folge hat.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir außerdem zeigen, dass die SP-D-mRNA-Expression in allen drei Gruppen der SP-A-/- Tiere im Vergleich zu den PBS/PBS-Tieren der wt-Tiere deutlich erhöht war, auch wenn sich der Vergleich zwischen den äquivalenten Tieren aus wt- und k.o.-Gruppe als nicht signifikant erwies und damit die zusätzliche Sensibilisierung und Provokation keinen Einfluss auf den SP-D-mRNA-Gehalt hatte. Daraus lässt sich vermuten, dass es sich bei der Zunahme der SP-D-mRNA um eine Kompensation des fehlenden SP-A handelt. Scheinbar reguliert

SP-A den Surfactantmetabolismus, in dem es dessen Sekretion durch Typ-II-Zellen inhibiert und die Aufnahme pulmonalen Surfactants in Alveolarmakrophagen und Typ-II-Zellen verstärkt. Fehlt SP-A nun als Regulationsprotein, wird die empfindliche pulmonale Surfactanthomöostase gestört. Um dies zu kompensieren gibt es zwei Möglichkeiten: die verstärkte Expression von Phosphatidylinositol durch SP-D, dass dann die SP-A Aktivität ersetzt (Poulain et al., 1999), oder eine Zunahme der relativen SP-B Menge (Mizuno et al., 1995).

#### **4.4 Bedeutung von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-4R $\alpha$**

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir eine erhöhte IL-4R $\alpha$ -Expression bei den mit OVA behandelten wt-Tieren nachweisen. Verschiedene frühere Untersuchungen zu diesem Rezeptor lassen vermuten, dass seine Expression auf pulmonalen Epithelzellen an der Entwicklung chronischer Atemwegsentzündung sowie Mucusüberproduktion beteiligt ist. Kelly-Welch et al. (2004) konnten zeigen, dass das Ausmaß des Entzündungsprozesses und der Mucusproduktion u.a. davon abhängig ist, ob IL-4R $\alpha$  auf myeloiden Zellen (z.B. Makrophagen, Monozyten) oder nicht-myeloiden Zellen wie z.B. dem Atemwegsepithel exprimiert wird. So führt die Interaktion mit auf myeloiden Zellen befindlichem IL-4R $\alpha$  zu einer verstärkten Entzündungsreaktion mit erhöhtem Influx eosinophiler Granulozyten in das betroffene Gewebe während über die Interaktion mit Atemwegsepithelzellen die Produktion von Mucus reguliert wird.

Haczku et al. (2006) beschrieben in der Vergangenheit, dass SP-D einerseits die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 inhibiert und andererseits in Anwesenheit dieser beiden Interleukine verstärkt synthetisiert wird. Unsere Untersuchungen an SP-D $^{-/-}$ -Tieren zeigten eine verstärkte Expression von IL-4R $\alpha$  in der Gruppe der Asthmatiere. Setzt man nun die von uns erhobenen Daten mit denen von Haczku et al. in Zusammenhang, scheint das Fehlen von SP-D zu einer verstärkten IL-4R $\alpha$ -mRNA Synthese zu führen. Eine mögliche Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Unterbrechung des Regulationskreislaufes: in wt-Tieren scheint die Interaktion von IL-4 mit IL-4R $\alpha$  zu einer verstärkten Synthese von SP-D zu führen, welches wiederum inhibitorisch auf CD4 $^{+}$ -Zellen wirkt und damit eine weitere Ausschüttung von IL-4 verhindert. SP-D $^{-/-}$  Tiere sind aufgrund des fehlenden SP-D-Gens nicht in der Lage dieses Surfactantprotein zu bilden und können diesen negativen Feedback-

Mechanismus folglich nicht aufrechterhalten. In Folge dessen scheint die verstärkte Expression von IL-4R $\alpha$  der Versuch einer SP-D-Synthese-Induktion zu sein, was den antiinflammatorischen Charakter dieses Proteins unterstreicht.

Unsere Untersuchungen an SP-A $^{-/-}$  Tieren zeigten anders als bei den SP-D $^{-/-}$  Tieren signifikant verminderte IL-4R $\alpha$ -mRNA-Spiegel in Typ-II-Pneumozyten. Karras et al (2007) wiesen in ihren Versuchen eine lokale Herunterregulation von IL-4R $\alpha$  durch IL-4R $\alpha$ -Antisense-Oligonukleotide und eine damit einhergehende, verminderte allergenbedingte Entzündungsreaktion nach. Demzufolge ist es möglich, dass die von uns beobachtete IL-4R $\alpha$ -mRNA-Minderexpression eine Reaktion auf das Fehlen von SP-A ist und versucht die über IL-4 vermittelten Entzündungsreize einzudämmen.

Der immunhistochemische Nachweis von IL-4R $\alpha$  zeigte bei wt-Tieren sowohl in der Kontroll- als auch in der Asthmagruppe eine verstärkte Anfärbbarkeit im Bereich der luftleitenden Wege. Bei den SP-D $^{-/-}$  Tieren zeigte sich trotz erhöhter IL-4R $\alpha$ -mRNA-Konzentration bei den Asthmatisieren keine erhöhte Anfärbbarkeit bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den SP-A $^{-/-}$  Asthmatisieren eine reduzierte Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche, im Bereich der luftleitenden Wege ließ sich das Protein noch schwach bei OVA/OVA-Tieren nachweisen, wohingegen es im Bereich der Alveolen nur noch bei den mit PBS/OVA, nicht aber bei den mit OVA/OVA behandelten Tieren nachweisbar war.

#### **4.5 Rolle von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-13R $\alpha$ 1 und IL-13R $\alpha$ 2**

IL-13 und die beiden Rezeptoren IL-13R $\alpha$ 1 und IL-13R $\alpha$ 2 beeinflussen viele der beim chronischen Asthma bronchiale beobachteten Entzündungsreaktionen und Umbauprozesse des Lungengewebes.

In unseren Untersuchungen in Typ-II-Zellen ließen sich weder bei den Kontroll- noch bei den Asthmatisieren der wt-, SP-D $^{-/-}$  bzw. SP-A $^{-/-}$  Tiere signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von IL-13R $\alpha$ 1 nachweisen, was darauf hindeutet, dass die mRNA-Expression dieses Rezeptors in Typ-II-Zellen unabhängig von pulmonaler Inflammation und der Anwesenheit von SP-D und SP-A verläuft.

Konträr zur IL-13R $\alpha$ 1-mRNA-Expression verhielt sich die IL-13R $\alpha$ 2-mRNA-Expression: IL-13R $\alpha$ 2-mRNA konnte lediglich bei den mit OVA sensibilisierten und



provozierten Tieren des Wildtyps und der SP-A<sup>-/-</sup> Tiere, nicht aber bei den SP-D<sup>-/-</sup> oder mit PBS/PBS bzw. PBS/OVA behandelten Tieren nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte einerseits eine deutlich verminderte, unter die Nachweisgrenze der RT-PCR fallende IL-13R $\alpha$ 2-mRNA-Expression sein. Andererseits ist auch denkbar, dass dieser Rezeptor nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern durch eine lokale Entzündungsreaktion – wie sie bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten Asthmatisieren auftritt – induziert wird. Hierfür sprechen auch Daten von Zhao et al. (2007) die die IL-13R $\alpha$ 2-mRNA- und Proteinexpression bei unveränderten IL-13R $\alpha$ 1-mRNA- und IL-4R $\alpha$ -Spiegeln durch Behandlung mit LPA (Lysophosphatidylsäure) in bronchialen Epithelzellen induzieren konnten.

Völlig gegensätzlich zur mRNA-Expression zeigte sich im Rahmen unserer immunhistochemischen Untersuchungen eine homogene Expression des IL-13R $\alpha$ 2-Proteins auf der Zelloberfläche von Typ-II-Pneumozyten bei den Kontrolltieren aller drei Gruppen, wohingegen das Protein bei den Asthmatisieren der drei untersuchten Gruppen nicht bzw. nur sehr gering nachweisbar war. Die Tatsache, dass die IL-13R $\alpha$ 2-mRNA nur bei asthmatischen Tieren nachweisbar und der Rezeptor auf der Zelloberfläche dieser Tiere nicht anfärbbar war, deutet darauf hin, dass die Entzündungsreaktion sowohl zu einer Verstärkung der mRNA-Expression als auch zu einer Umverteilung des Proteins führt. Die stärkere Anfärbbarkeit des Rezeptors in der Gruppe der Kontrolltiere deutet auf eine Konversion des Rezeptors von der zelloberflächlichen Form zur intrazytoplasmatischen, löslichen Form hin.

Wie eingangs bereits erwähnt stellt IL-13R $\alpha$ 2 eine Art Lockvogelrezeptor dar, der IL-13 mit einer gegenüber IL-13R $\alpha$ 1 zirka 100-300-fach erhöhten Affinität bindet. Allerdings setzt der Rezeptor keine proinflammatorische Signalkaskade in Gang, sondern bewirkt vielmehr eine Abschwächung des Entzündungssignals und verhindert in Folge dessen die Ausprägung eines asthmatypischen Phänotyps. Betrachtet man nun die von uns erhobenen Ergebnisse, scheint das Fehlen von SP-A keinen Einfluss auf die Expression von IL-13R $\alpha$ 2-mRNA zu haben, wohingegen das Fehlen von SP-D einen negativen Einfluss auf die Transkription von IL-13R $\alpha$ 2 zu haben scheint und damit die Entstehung eines chronisch-allergischen Asthmas begünstigt.

#### **4.6 Relevanz von SP-A und SP-D bei der Expression von TNF $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2**

Da das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  und seine beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 an der Entstehung und Chronifizierung des Asthma bronchiale beteiligt sind, haben wir die Bedeutung von SP-A und SP-D bei Transkription und Expression des Proteins bzw. seiner Rezeptoren untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentration im Plasma der mit PBS/PBS behandelten Wildtyp- und SP-D-/- Tiere. Bei den SP-A-/- Tieren verzeichneten wir einen Anstieg der TNF $\alpha$ -Plasmakonzentration bei den asthmatischen Tieren.

Im BAL-Material ließ sich TNF $\alpha$  nur bei den Asthmastieren der wt- und der SP-D-/- Gruppe nachweisen. Dabei zeigten sich bei den K.O. – Tieren nahezu doppelt so große Mengen wie in der wt-Gruppe. In Zusammenschau mit Daten von Hortobágyi et al. (2008) deutet dies darauf hin, dass SP-D die pulmonale Expression von TNF $\alpha$  inhibiert und bekräftigt damit die antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Surfactantkomponente.

Die Untersuchung der Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 zeigte ein homogenes Expressionsmuster bei allen drei wt-Gruppen. Bei den SP-/- Tieren zeigte sich eine verstärkte Expression in der Gruppe der Asthmatiere. Interpretiert man unsere Ergebnisse im Kontext mit den Daten von Nakae et al. (2007), die zeigen konnten, dass sowohl lösliches TNF $\alpha$  als auch die beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 zur Initiierung und Chronifizierung der Entzündungsreaktion bei chronisch-allergischem Asthma bronchiale beitragen, wird deutlich, dass das Fehlen von SP-D zu einer verstärkten proinflammatorischen Immunantwort führt und die für Asthma bronchiale pathognomonischen Umbauprozesse begünstigt.

Gegensätzlich zu den in der wt- bzw. SP-D-/- Gruppe erhobenen Ergebnissen verhielten sich unsere bei den SP-A-/- gemachten Beobachtungen: die alleinige Provokation mit OVA führte bereits zu einem signifikanten Abfall der TNFR1- und TNFR2-mRNA-Expression. Auch immunhistologisch ließ sich eine verminderte TNFR1-Expression auf der Zelloberfläche nachweisen. Dies deutet auf einen proinflammatorischen Effekt von SP-A hin. Im Vergleich mit der Literatur wird dies allerdings kontrovers diskutiert: in der Mehrzahl der Fälle konnte eine Suppression der TNF $\alpha$ -Expression, d.h. ein antiinflammatorischer Effekte von SP-A nachgewiesen werden (Ledford et al., 2009). Allerdings konnten Kremlev et al. (1997) und Song et al. (2000) während ihrer

Untersuchungen an der Zelllinie THP-1 einen durch SP-A hervorgerufenen Anstieg proinflammatorischer Zytokine nachweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist in den von Gardai et al. (2003) Untersuchungen zu sehen, die zeigen konnten, dass die Interaktion der kollagenen Schwanzregion des SP-A-Proteins mit dem auf z.B. Makrophagen exprimierten Calreticulin-CD91-Komplexes über eine Aktivierung von p38 und NF $\kappa$ B die Produktion proinflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren induziert respektive verstärkt.

#### **4.7 Bedeutung von SP-A und SP-D bei der Expression von IL-10R $\alpha$ und IL-10R $\beta$**

Wie bereits aus früheren Untersuchungen bekannt ist, besteht die Hauptaufgabe von IL-10 in der Eindämmung respektive Unterbrechung proinflammatorischer Prozesse. Vermittelt werden die antiinflammatorischen Eigenschaften durch die Interaktion des Interleukins mit dem IL-10-Rezeptor (IL-10R), der als Heterodimer jeweils aus den zwei Untereinheiten, IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$ , gebildet wird. Dabei fungiert die IL-10R $\alpha$ -Untereinheit als hochaffine Bindungsstelle für IL-10, während durch IL-10R $\beta$  das Ingangsetzen der Signaltransduktionskaskade, an deren Ende die Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine steht, vermittelt wird.

Unsere Untersuchungen zu IL-10R $\alpha$  zeigten bei den wt-Tieren ein homogenes, von der Art der Sensibilisierung bzw. Provokation unabhängiges Expressionsmuster. In der Gruppe der SP-D $^{-/-}$  Tiere führte bereits die Provokation mit OVA zu einer verstärkten Expression des Rezeptors in Typ-II-Zellen, wohingegen sich bei den SP-A $^{-/-}$  Tieren eine signifikante Abnahme der IL-10R $\alpha$ -Expression in der Gruppe der mit OVA sensibilisierten und provozierten Asthmatiere zeigte. Frühere Untersuchungen von Weber-Nordt et al. (1994) konnten bekräftigen, dass die IL-10R $\alpha$ -Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen vielfach nicht konstitutiv erfolgt, sondern vielmehr durch Stimulation mit beispielsweise LPS induziert werden kann. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen lässt sich nun vermuten, dass das Fehlen von SP-D keinen Einfluss auf die IL-10R $\alpha$ -Expression besitzt, sondern vielmehr durch die Anwesenheit von SP-A kompensiert werden kann. Das Fehlen von SP-A bewirkt eine Abnahme der IL-10R $\alpha$ -Expression. Eine mangelnde IL-10R $\alpha$ -Expression führt dazu, dass weniger antiinflammatorisch wirkendes IL-10 binden kann und bedingt somit indirekt das

Überwiegen proinflammatorischer Zytokine, die den Entzündungsprozess unterhalten. Der antiinflammatorische Einfluss von SP-A konnte auch durch Samten et al. (2008) bekräftigt werden. Sie konnten in ihren Untersuchungen mit dem am SP-A-Rezeptor SP-R210 agonistisch wirkenden Antikörper  $\alpha$ -SP-R210n eine verstärkte Expression von IL-10 nachweisen.

Unsere Untersuchungen zu dem konstitutiv auf verschiedenen Zellen und Geweben verteilten IL-10R $\beta$  zeigten ein annähernd homogenes Expressionsmuster in wt-Tieren, SP-A-/- und SP-D-/- Tieren. Dies deutet daraufhin, dass die Expression dieses Rezeptors zum einen nicht durch das Setzen eines Entzündungsreizes induziert wird (Moore et al., 2001) und zum anderen von der Anwesenheit von SP-A oder SP-D unabhängig ist.

## 5 Zusammenfassung

Asthma bronchiale bezeichnet eine chronische Erkrankung des Respirationstraktes, die durch eine Entzündungsreaktion und bronchiale Hyperreagibilität gegenüber verschiedenen endogenen und exogenen Noxen charakterisiert ist. Durch die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine kommt es zu einer pulmonalen Entzündungsreaktion, die vor allem durch IL-4, IL-13, TNF $\alpha$  und IL-5 vermittelt wird.

Pulmonaler Surfactant ist ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Lipiden und Proteinen, dessen Hauptaufgabe in der Reduktion der Oberflächenspannung an der pulmonalen Luft-Flüssigkeits-Grenze steht. Zusätzlich hierzu spielen einige Bestandteile, die Surfactantproteine (SP-) A und D, eine wichtige Rolle als Brücke zwischen angeborener und erworbener pulmonaler Immunität. So fungieren SP-A und SP-D im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr als Erkennungsmoleküle für verschiedene Noxen und vermitteln hierüber Opsonierung und Agglutination von Pathogenen, Chemotaxis verschiedener Immunzellen, Phagozytose von Pathogenen sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen. Darüber hinaus interagieren SP-A und SP-D mit T-Lymphozyten und führen so u.a. zu einer verminderten IL-2 Produktion.

Um den Einfluss der beiden Surfactantproteine SP-A und SP-D auf die Regulation pro- bzw. antiinflammatorischer Interleukinrezeptoren im Rahmen eines chronischen Asthma bronchiale zu eruieren, wurde in mit Ovalbumin (OVA) sensibilisierten C57BL/6 Wildtyp- (wt), SP-A/- und SP-D/- Tieren durch eine zwölfwöchige Allergenexposition mit OVA ein chronisch allergisches Asthma induziert (Asthmagruppe). Parallel hierzu wurden mit Phosphatpuffer (PBS) sensibilisierte und provozierte C57BL/6 wt-, SP-A/- und SP-D/- Tiere als Kontrollgruppe mitgeführt. Nach erfolgter Allergenprovokation wurde das Expressionsmuster von IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, TNFR1, TNFR2, IL-10R $\alpha$  und IL-10R $\beta$  auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Detektionsfärbung bestimmt.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir bei den wt-Tieren bereits nach alleiniger Provokation mit OVA eine gesteigerte IL-4R $\alpha$ -mRNA-Expression nachweisen. Ferner konnten wir, analog zu Untersuchungen von Haczku und Cao et al. (2001; 2004), bei ihnen eine gesteigerte SP-D-Expression bei unveränderten SP-A-Spiegeln nachweisen. Die Interleukinrezeptoren TNFR1, TNFR2, IL-13R $\alpha$ 1 und IL-

10R $\alpha$  zeigten in der Asthmagruppe der wt-Gruppe keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den mit PBS/PBS behandelten Kontrolltieren der wt-Gruppe. Die Expression des Lockvogelrezeptors IL13R $\alpha$ 2 konnte bei den wt-Tieren nur in der Gruppe der Asthmatiere nachgewiesen werden.

Unsere Untersuchungen an SP-D-/- Tieren zeigten eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokinrezeptoren IL-4R $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2 sowie eine erhöhte Expression des antiinflammatorischen Interleukinrezeptors IL-10R $\alpha$  in der Gruppe des Asthmatiere. Das Expressionsmuster von IL-13R $\alpha$ 1 wies im Vergleich zu den wt-Tieren keine wesentlichen Veränderungen auf. IL-13R $\alpha$ 2-mRNA konnte in keiner der drei Behandlungsgruppen bei SP-D-/- Tieren nachgewiesen werden.

In Abwesenheit von SP-A zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von IL-4R $\alpha$ , TNFR1, TNFR2 und IL-10R $\alpha$ . Die Expression von SP-D war in allen drei Behandlungsgruppen der SP-A-/- Tiere im Vergleich zu den wt-Tieren erhöht. Die Untersuchungen zu IL-13R $\alpha$ 1 zeigten - verglichen mit den wt-Tieren - keine signifikanten Veränderungen bei den SP-A-/- Tieren. Die Expression von IL-13R $\alpha$ 2 war analog zu den wt-Tieren nur bei den Asthmatieren nachweisbar und im Vergleich zu ihnen erhöht. Die immunhistologischen Untersuchungen bestätigten die auf Transkriptionsebene erhobenen Ergebnisse mit Ausnahme des IL-13R $\alpha$ 2: hier zeigte sich auf zellulärer Ebene eine homogene Expression bei den mit PBS/PBS und PBS/OVA behandelten SP-A-/-, SP-D-/- und wt-Tieren, während der Rezeptor auf der Zelloberfläche der mit OVA/OVA behandelten SP-A-/-, SP-D-/- und wt-Tiere nicht nachweisbar war.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Surfactantproteine an der Modulation der Immunantwort im Rahmen des chronisch allergischen Asthma bronchiale beteiligt sind. Dabei scheint SP-D einer verstärkten Expression der proinflammatorischen Interleukinrezeptoren IL-4R $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2 entgegen zu wirken und inhibiert somit die für chronisches Asthma bronchiale charakteristische T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort. In Bezug auf SP-A implizieren unsere Ergebnisse sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. So führt das Fehlen von SP-A zu einer verminderten Expression der proinflammatorischen Interleukinrezeptoren IL-4R $\alpha$ 1, TNFR1 und TNFR2. Gleichzeitig führt die Abwesenheit von SP-A allerdings auch zu einer verminderten Expression des antiinflammatorischen IL-10R $\alpha$ , was seine entzündungshemmenden Eigenschaften unterstreicht.

## 6 Literaturverzeichnis (alphabetisch)

**Aggarwal BB:** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3: 745-756.

**Akbari O**, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med 2003;9:582–588.

**Amrani Y, Chen H, Panettieri Jr RA:** Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? Respir Res 2000; 1:49-53

**Atochina EN, Beers MF, Tomer Y, Scanlon ST, Russo SJ, Panettier RA, Haczku A :** Attenuated allergic airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice is associated with enhanced surfactant protein D production following allergic sensitization. Respire Res 2003; 4:15-21

**Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG:** Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. Genomics. 1996 Oct 1;37(1):41-50.

**Baud V, Karin M.:** Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol. 2001, 11: 372-377.

**Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S:** Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking protein D. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998; 95:11869-11874

**Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius**

**E:** Allergy and Endotoxin Study Team: Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):869-77.

**Cao Y, Tao JQ, Bates SR, Beers MF, Haczku A:** Il-4 induces production of lung collectin surfactant protein D. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:439-444

**Chen G, Goeddel DV:** TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296:1634-1635.

**Cheng G, Ueda T, Numao T, Kuroki Y, Nakajima Y, Fukushima Y, Motojima S, Fukuda T:** Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 2000 ; 16:831-835

**Choy EHS, Panayi:** Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis(Review). *N Engl J Med* 2001; 344: 907-916

**Cohn L, Elias JA, Chupp GL:** Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.

**Crouch EC, Wright JR:** Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 521-54

**Daines MO, Hershey GK:** A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma. *J Biol Chem* 2002, 277: 10387-10393

**Danahay H, Atherton H, Jones G, Bridges RJ, Poll CT:** Interleukin-13 induces a hypersecretory ion transport phenotype in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L226–L236.

**Dienger KM, Wills-Karp M:** Interleukin-13 regulation of complement factor 3 production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:A733.



**Ebina M, Yaegashi H, Chiba R, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M:** Hyperreactive Site in the Airway Tree of Asthmatic Patients revealed by Thickening of Bronchial Muscles. *Am. Rev. Respir. Dis. Cell Mol. Biol.* 1990;141:1327-1332.

**Ebina M, Takahashi T, Chiba R, Motomiya M:** Cellular Hypertrophy and Hyperplasia of Airway Smooth Muscle underlying Bronchial Asthma. *Am. Rev Respir. Dis. Cell Mol. Biol.* 1993;148:720-726

**Evans DJ, Lindsay MA, O'Connor BJ, Barnes PJ:** Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge. *Eur. Respir. J.* 9, 703-708 (1996).

**Fehrenbach H:** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2001;2(1):33-46.

**Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, Arinobu Y, Akaiwa M, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Sasaki S, Hamasaki N, Izuhara K, Shirakawa T, Hopkin JM:** Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet.* 2000 May;37(5):380-2.

**Graber P, Gretener D, Herren S, Aubry JP, Elson G, Poudrier J:** The distribution of IL-13 receptor alpha 1 expression on B cells, T cells, and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4. *Eur J Immunol* 1998;28:4286–4298.

**Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P:** The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995, 83:793-802.

**Haczku A, Atochina EN, Tomer Y, Chen H, Scanlon ST, Russo S, Xu J, Panettieri Jr. RA, Beers MF:** *Aspergillus fumigatus*-induced allergic airway inflammation alters surfactant homeostasis and lung function in BALB/c mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:45-50

**Haczku A, Cao Y, Vass G, Kierstein S, Nath P, Atochina-Vassermann EN, Scanlon ST, Li L, Griswold DE, Chung FK, Poulain FR, Hawgood S, Beers MF, Crouch EC:** IL-4 and IL-13 form a negative feedback circuit with surfactant protein D in the allergic airway response. *J Immunol* 2006; 176:3557-3565

**Hallsworth MP, Soh CPC, Lane SJ, Arm JP, Lee TH:** Selective enhancement of GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-8 production by monocytes and macrophages of asthmatic subjects. *J Eur. Respir.* 1994;7: 1096-1102

**Hehlhans T, Pfeffer K:** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1-20.

**Heinzmann A, Blattmann S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA:** Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. *Eur J Immunogenet.* 2000 Jun;27(3):121-7.

**Hesse M :** Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of 1-arginine metabolism. *J Immunol* 2001;167:6533–6544.

**Hickmann-Davis JM, Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR, Wright JR:** Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L517-23

**Hirst SJ.:** Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur. Resp. J.* 1996;9:808-820.

**Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y:** A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:906-9.

**Hoffjan S, Ober C:** Present status on the genetic studies of asthma. *Current Opinion in Immunology* 2002; 14:709–717.

**Holgate ST:** The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. Lancet 350 Suppl 2, SII5-SII9 (1997)

**Holt PG:** Downregulation of immune responses in the lower respiratory tract: role of alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol 1985;63:261-270.

**Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM:** Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993 Apr 23;260(5107):547-9.

**Idriss HT, Naismith JH:** TNF  $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc. Res. Tech. 2000; 50: 184-195

**Ingram JL, Rice A, Geisenhoffer K, Madtes DK, Bonner JC:** Interleukin-13 stimulates the proliferation of lung myofibroblasts via a signal transducer and activator of transcription-6-dependent mechanism: a possible mechanism for the development of airway fibrosis in asthma. Chest 2003;123:422S–424S

**Janeway CA, Travers P:** Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1995

**John AE, Berlin AA, Lukacs NW:** Respiratory syncytial virus-induced CCL5/RANTES contributes to exacerbation of allergic airway inflammation. Eur J Immunol. 2003 Jun;33(6):1677-85.

**John M, Au BT, Jose PJ, Lim S, Saunders M, Barnes PJ, Mitchell JA, Belvisi MG, Chung KF:** Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998; 18:84-90.

**John M, Hirst SJ, Jose PJ, Robichaud A, Berkman N, Witt C, Twort CHC, Barnes PJ, Chung KF:** Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in

response to TH-1 cytokines: Regulation by TH-2 cytokines and corticosteroids. J. Immunol. 1997;158:1841-1847.

**Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG:** Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:1699-1971.

**Juntti H, Kokkonen J, Dunder T, Renko M, Niinimäki A, Uhari M:** Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. Allergy. 2003 Sep;58(9):878-84.

**Kazuyoshi K, Nobuyuki H:** Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 22:147-149

**Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T:** IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. Journal of Allergy & Clinical Immunology 2000, 105:327-32

**Kishore U, Madan T, Sarma PU, Singh M, Urban BC, Reid KB:** Protective roles of pulmonary surfactant proteins, SP-A and SP-D, against lung allergy and infection caused by *Aspergillus fumigatus*. Immunobiol 2002; 205:610-618.

**Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsmann KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA:** Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1996; 93:9594-9599

**Lee CG :** Interleukin-13 induces tissue fibrosis by simulating and activating transforming growth factor beta (1). J Exp Med 2001;194:809–821.

**Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW:** Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. J Immunol 1994, 152:1821-9

**Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, Gillis D, Ireland R, Olwell E, Park S:** Interleukin-5, interleukin-3, and granulocytemacrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol Chemistry* 1991, 266:24741-24747.

**Loppnow H:** Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist* 2001; 42: 13-27

**Lukacs NW :** Respiratory syncytial virus predisposes mice to augmented allergic airway responses via IL-13-mediated mechanisms. *J Immunol* 2001;167:1060–1065.

**Madsen J, Kliem A., Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U:** Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000; 164: 5866-5870

**Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Jensenius JC, Sim RB:** Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A). *Biosci Rep* 1993; 13:79-90

**Maziak W, Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK, Keil U:** Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy*. 2003 Jul;58(7):572-9.

**Meurs H:** Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 2002;136:391–398.

**Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M:** The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15:61-76.

**Montefort SR, Djukanovic ST, Holgate WR, Roche:** Ciliated cell damage in the bronchial epithelium of asthmatics and non-asthmatics. Clin. Exp. Allergy 1993;23:185-189.

**Moore PE, Calder M, Amrani Y, Panettieri RA Jr, Shore SA:** Effect of Th2-cytokines on human airway smooth muscle responses to LTD4. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:A116.

**Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A:** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001, 19 :683-765.

**Mosmann T, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL:** Two types of murine T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 1986; 136: 2348-2357

**Mowen KA, Glimcher LH:** Signaling pathways in Th2 development. Immunol Rev. 2004, 202: 203-22.

**Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S:** IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. J Immunol. 1992 Nov 1;149(9):2977-83.

**Paul WE:** Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 1991, 77: 1859-1870.

**Pazdrak K, Stafford S, Alam R:** The activation of the Jak-STAT 1 signaling pathway by IL-5 in eosinophils. Journal of Immunology 1995, 155:397-402.

**Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE:** IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. J Immunol 1993, 151:1280-9.

**Rahaman SO, Sharma P, Harbor PC, Aman MJ, Vogelbaum MA, Haque SJ:** IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2002, 62: 1103-1109

**Reid KB:** Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 290-295

**Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team:** Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001 Oct 6;358(9288):1129-33.

**Rothenberg ME:** Eosinophilia. [Review] [72 refs]. *New England Journal of Medicine* 1998, 338(22):1592-600

**Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD:** Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40.

**Saunders MA, Mitchell JA, Seldon PM, Yacoub JH, Barnes PJ, Giembycz MA, Belvisi MG:** Release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human cultured airway smooth muscle cells: suppression by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol*. 1997;120:545-6.

**Schaub B, Westlake RM, He H, Arestides R, Haley KJ, Campo M, Velasco G, Bellou A, Hawgood S, Poulain FR, Perkins DL, Finn PW:** Surfactant protein D deficiency influences allergic immune responses. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1819-1826

**Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., McIntyre BW:** IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 1992, 148: 1086-1092

**Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E:** Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur J Immunol.* 1990 Aug;20(8):1709-15.

**Schuh JM, Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM:** Chemokines and cytokines. axis and allies in asthma and allergy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:503–510.

**Strachan DP:** Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.

**Takeda K, Miyahara N, Rha YH, Taube C, Yang ES, Joetham A, Kodama T, Balhorn AM, Dakhma A, Duez C, Evans AJ, Voelker DR, Gelfend EW:** Surfactant protein D regulates airway function and allergic inflammation through modulation of makrophage function. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:783-789

**Tattersfield A, Knox A, Britton J, Hall IP:** Asthma. *Lancet* 2002; Vol 360

**Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der, Heyden J, Fiers W, Plaetinck G:** A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 1991, 66:1175-1184.

**Thomas PS:** Tumour nekrosis factor- $\alpha$ : The role of this multifunktional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol* 2001;79: 132-140

**Vaandrager AB, van Golde LM:** Lung surfactant proteins A and D in innate immune Defense. *Biol Neonate* 2000; 77 (suppl 1): 9-13

**van Rozendaal BA, v.G.L., Haagsman HP:** Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20: 319-339

**Varner AE:** The increase in allergic respiratory disease: survival of the fittest? *Chest* 2002;121:1308-16



**Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul JP, Michel FB, Godard P:** HLA-DR and ICAM I expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148:689-694.

**Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P:** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.*, 2003, 10:45-65.

**Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson, CJ, Kay AB:** IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunol* 1990, 71:258-265.

**Wan H:** Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Development* 2003;131:953–964.

**Wang JY, Shieh CC, Yu CK, Lei HY, Reid KB:** Inhibitory effects of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:510-518.

**Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA:** Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; 97:5972-5977

**White MK, Strayer DS:** Survival signaling in type II pneumocytes activated by surfactant protein-A. *Exp Cell Res* 2002;280(2):270-279.

**Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA:** Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* . 2003; 285(1):L32-42.

**Williams CM, Galli SJ:** Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* 2000;192:455-62.

**Williams CM, Galli SJ:** The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:847-59.

**Zheng T:** Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106:1081–1093.

**Zhou Y:** Characterization of a calciumactivated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:486–491.

**Zhu Z:** IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol* 2002; 168:2953–2962.

**Zimmerman N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME:** Chemokines in asthma. Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:227–242.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
AL(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
CBA	Cytometric-Bead-Array
CD	cluster of differentiation
ICAM-1	inter cellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
INF	Interferon
MHC II	major histocompatibility complex II
NO	Stickstoffmonoxid
SP-A <sup>-/-</sup>	Surfactantprotein A knock out
SP-D <sup>-/-</sup>	Surfactantprotein D knock out
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM-1	vascular adhesion molecule 1
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

## 8 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Diogo
Vorname:	Isabell
Geburtsdatum:	16.03.1985
Geburtsort:	Plauen
Adresse:	Hals-Nasen-Ohren-Klinik Universitätsklinikum Giessen – Marburg Standort Marburg Deutschhausstraße 3 35037 Marburg
	eMail: <b>diogoi@staff.uni-marburg.de</b>
	Tel: 06421-58-62850

### Schul Ausbildung

1991-1995	Grundschule Friedrich Rückert, Plauen
1995-2003	Lessing-Gymnasium Plauen

### Hochschulausbildung

10/2003-11/2009	Humanmedizinstudium an der Philipps-Universität Marburg
-----------------	--

09/2005                      Erste Ärztliche Prüfung

11/2009                      Zweite Ärztliche Prüfung

### **Famulaturen**

03-04/2006                      Hämatoonkologie, Plauen

03-04/2007                      Kardiologie, Marburg

07-08/2007                      HNO, Marburg

01-04/2008                      Chirurgie, Uster (Schweiz)

### **Zusatzqualifikation**

03/2008                      Erwerb            der            Voraussetzung            zum  
Transfusionsverantwortlichen

## **9 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privatdozenten:

Aumüller, Barth, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Görg, Kann, Koolmann, Kretschmer, Kroll, Lohoff, Löffler, Löffler, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Ramaswamy, Renz, Röhm, Röper, Rothmund, Sesterhenn, Steiniger, Teymoortash, Wagner, Weihe, Werner.

## 10 Danksagung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Abteilung für Pneumologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Claus Vogelmeier angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Müller möchte ich für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seinem Labor durchführen zu können, danken. Besonderer Dank gebührt der ersten „Labor-Mutti“ Frau Dr. Renate Hochscheid für die aufopferungsvolle und hervorragende wissenschaftliche Unterstützung und die zahlreichen lustigen Laborstunden. Auch Frau Elke Kotte, der zweiten „Labor-Mutti“, möchte ich für ihre Mitbetreuung danken.

Den Arbeitsgruppen um Herrn Dr. Holger Garn und Herrn Robert Bals möchte ich für die Unterstützung bei der Mitbenutzung ihrer Laborgerätschaften danken. Auch gebührt dem hiesigen Institut für Pathologie ein Dank für die Benutzung und Einarbeitung in die Handhabe ihres Mikrotoms.

Und ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei der Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit stets unterstützt und motiviert haben.

## 11 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**Die Bedeutung der Surfactantproteine SP-A und SP-D bei der Modulation des Entzündungsprozesses im Rahmen des chronischen Asthma bronchiale**

in der Abteilung für Pneumologie unter Leitung von Prof. Dr. C. Vogelmeier in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie und mit Unterstützung der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 10.10.2010

Isabell Diogo